



Université Claude Bernard- Lyon 1

Ecole doctorale Neurosciences et Cognition

N° d'ordre : 101-2012

THÈSE

pour le

DIPLOME DE DOCTORAT

Mention : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 2012

par

Cynthia EL HAGE

L'ANXIETE LIEE AU SEVRAGE A LA COCAINE :

Etude comportementale et neuroanatomique

Membres du jury

Président : Pr. Luc Zimmer, Université de Lyon, Lyon, France

Rapporteur : Pr. Stefania Maccari, Université de Lille, Lille, France

Rapporteur : Dr. Florence Noble, Université Paris-Descartes, Paris, France

Examineur : Dr. Catherine Le Moine, Université Victor Segalen, Bordeaux, France

Examineur : Dr. Pierre-Hervé Luppi, Université de Lyon, Lyon, France

Directrice de thèse : Dr. Anne Bérod, Université de Lyon, Lyon, France

L'ANXIÉTÉ LIÉE AU SEVRAGE À LA COCAÏNE

Étude comportementale et neuroanatomique

Résumé

L'anxiété est un symptôme prédominant au cours des périodes initiales de sevrage à la cocaïne et est considéré comme un facteur important de rechute. Le but de cette étude était de caractériser les dysfonctionnements cérébraux qui pourraient contribuer à l'expression de cet état pathologique chez le rat.

Les rats sont traités avec de la cocaïne en chronique et le comportement anxieux est évalué au cours du sevrage dans différents paradigmes expérimentaux (tests du labyrinthe en croix surélevé, du confinement dans un bras ouvert surélevé et de l'enfouissement défensif). Nos résultats ont montré que le sevrage à la cocaïne induit un état anxieux élevé qui persiste pendant au moins 28 jours de sevrage. Nous avons ensuite utilisé l'immunohistochimie de Fos pour comparer les patterns d'activation cérébrale chez les rats sevrés et témoins après exposition au test de l'OA. Nos données ont montré que l'anxiété élevée des rats sevrés était accompagnée d'une altération de la réactivité des neurones glutamatergiques de la partie dorsale du cortex préfrontal médian (dCPFm) et de certaines régions sous-corticales (aires hypothalamiques latérale et antérieure et le noyau paraventriculaire du thalamus). Nous avons ensuite montré que l'inactivation pharmacologique du dCPFm avec du muscimol atténuait les comportements anxieux des rats sevrés suggérant ainsi une hyperréactivité de cette région corticale durant le traitement des informations de type anxieux. Notre étude amène des données nouvelles quant aux substrats neuronaux sous-tendant l'anxiété pathologique observée au cours du sevrage à la cocaïne et souligne l'importance du CPFm dans la régulation de cet état d'anxiété pathologique.

Mots-clés: Cocaïne, anxiété, immunohistochimie de Fos, cortex préfrontal médian, muscimol

ANXIETY DURING COCAINE WITHDRAWAL

Behavioral and neuroanatomical study

Abstract

Anxiety is one of the prevailing symptoms observed during the initial period of abstinence in cocaine abusers and is considered as an important factor of relapse. The aim of this study was to provide further insight into the cerebral dysregulations that might contribute to this pathological state in rats.

Rats were treated chronically with cocaine and anxiety-behaviors were assessed in different paradigms during withdrawal (elevated plus maze, open arm and shock probe burying tests). Our results demonstrated that cocaine withdrawal induced persistent heightened levels of anxiety that last for at least 28 days. We then used Fos immunohistochemistry to map neuronal activation patterns in withdrawn rats confined to one open arm (OA) of an elevated plus maze. Our data showed that the exacerbated anxiety observed in cocaine treated rats exposed to an OA was accompanied by an altered reactivity of the dorsal part of the medial prefrontal cortex (dmPFC) glutamatergic neurons and some sub-cortical regions (anterior and lateral hypothalamic areas and the paraventricular nucleus of the thalamus). Finally, we showed that pharmacological inactivation of the dmPFC with muscimol considerably attenuated anxiety-related behaviors in cocaine withdrawn rats suggesting an exaggerated response of this cortical area during the processing of anxiogenic stimuli. The present study provides new data on the neural substrate underlying pathological anxiety observed during cocaine withdrawal and highlights the importance of the dmPFC in the regulation of this pathological anxiety state.

Keywords: Cocaine, anxiety, Fos immunohistochemistry, medial prefrontal cortex, Muscimol

Je tiens à remercier :

Le Professeur Luc ZIMMER, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Je le remercie sincèrement pour tout le soutien qu'il m'a apporté durant les premières années de thèse en m'accueillant au sein de son laboratoire.

Le Professeur Stefania MACCARI et le Docteur Florence NOBLE, pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, pour le temps qu'elles ont consacré à la lecture et à la critique de ce manuscrit, et l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail.

Le Professeur Pierre-Hervé LUPPI et le Docteur Catherine LEMOINE qui ont accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Anne BEROD, qui a supervisé ce travail et m'a initiée à la recherche en Neurosciences et qui m'a surtout appris la patience, la persévérance et peut-être je l'espère la rigueur qui est l'une de ses qualités premières ! Merci de m'avoir poussée à la perfection et d'avoir corrigé mon manuscrit avec le plus grand soin, un grand merci à toi Anne!

Hélène SCARNA, avec qui j'ai partagé mes joies et mes peines et qui m'a redonnée de la confiance quand cela me manquait. Tu as été beaucoup plus qu'une collègue de travail Hélène, tu étais ma confidente et mon « soutien familial » dans mon lieu de travail !

Laura LAMBÁS-SEÑAS qui m'a soutenue et qui a su m'écouter dans les moments où la fin semblait loin et la route longue.

Guillaume LUCAS avec qui j'ai eu de longues discussions et qui a toujours montré de l'enthousiasme et de la curiosité dans ses discours concernant mon pays, le Liban. Je tiens surtout à le remercier pour m'avoir aidée à trouver un stage postdoctoral à Montréal. Grâce à toi, je pars bientôt pour une nouvelle aventure !

Nasser HADDJERI qui savait rajouter une touche humoristique quand il en fallait pour égayer mes journées parfois longues et fatigantes.

Je tiens également à remercier les autres membres de notre laboratoire qui ont participé de près ou de loin à mon travail notamment Jean-Marie VAUGEOIS, Luc DENOROY, Malika EL-YACoubi et Céline LUCAS.

Merci à Valérie CHARLON et Christianne BARDELLI pour m'avoir aidée dans tout ce qui concerne les choses administratives et la paperasserie qui n'en finit jamais.

Un grand merci à Anne-Laure qui m'a beaucoup aidée dans toutes les expériences réalisées avec une efficacité et une rapidité impressionnantes. Sans toi le travail n'aurait jamais pu se réaliser Miss merci beaucoup !

Merci à Virginie avec qui j'ai eu des discussions constructives à propos de l'avancement du projet de travail de notre équipe et qui a également participé à certaines de mes expériences de comportement chez le rat.

Un grand merci à ma collègue de travail la plus fidèle et la plus proche, Erika ABRIAL, « mon amie du labo » et en dehors du labo, avec qui j'ai partagé ma chambre durant les congrès et un séjour inoubliable au Liban. Merci pour tes aides techniques (Power Point et autre,...) qui m'ont sortie de la galère bien des fois et courage à toi pour tes derniers mois de thèse je penserai bien à toi !

Sans oublier :

Cécile, Magali, Marion et les «nouveaux jeunes» Eddy, Yazid, Charlène, Magalix avec qui j'ai passé des moments mémorables à table pour le repas du midi où nos discussions portaient souvent sur...en tout cas c'était bien marrant les amis !

Sarah, Mickael, Mahdi, Francesca, Leslie et Olivier avec qui j'ai partagé des moments sympas en dehors de l'ambiance tendue du boulot !

Ceux qui sont déjà partis Adeline, Laure, Elise, Julien, Jean-Baptiste, Elisabeth, les 2 Julie et Cyril et une pensée spéciale à mon ami Chris que je vais vite rejoindre au Canada !

Un grand merci à tous les membres de l'équipe du laboratoire d'Immunologie au Liban où j'ai effectué mon tout premier stage dans le domaine de la recherche : merci à Hasnaa Bouharoun-Tayoun et Soulaïma Chamat de m'avoir initiée et encouragée à me lancer dans le monde passionnant de la recherche, merci à Catherine et Najiba qui m'ont appris ce que signifiait le travail d'équipe et la bonne ambiance au travail. Merci surtout à toi Hasnaa pour toutes les heures que tu as passé avec moi au téléphone à me convaincre de ne pas ranger ma valise et rentrer au Liban !

Mes amis les plus chers : Cynthia (Yakhte), Mhamad, Raymond, Anthony, Marthe et Salomé qui m'ont soutenue dans les moments les plus difficiles et qui ont été à mes côtés ces dernières années : vous êtes « ma famille française », Jess et Jijati et surtout Lola et Mauni qui malgré la distance et le décalage horaire ne m'ont pas laissée un jour sans me rassurer et me soutenir, vous êtes loin mais vous êtes les plus proches à mes yeux et bien au fond de mon cœur ! Grâce à vous tous je connais le secret de l'Amitié ! Je vous aime pour la vie les amis vous me comblez de bonheur !

Un merci à toute ma famille libanaise ainsi qu'à Elhamo, Nana et têtà Marie.

Le plus grand merci est dédié à mes parents et mon frère Teddy, nous habitons dans les quatre coins du monde mais je ne connais pas de famille aussi soudée et unie que la nôtre, merci d'avoir cru en moi, en mes capacités, je sais combien cela a été dur pour vous de me laisser partir mais vous ne m'avez jamais retenue malgré les difficultés de la séparation. Ce travail vous est dédié puisque vous en êtes le pilier. Il n'y a pas plus grande preuve d'amour que de laisser son enfant voler de ses propres ailes ! Pour cela et pour tant d'autres choses, je vous aime ! Notre union fait notre force et ce sera ainsi pour toujours !

Pour finir, une pensée pour mon pays, le Liban ! Je suis fière d'être libanaise et j'espère qu'un jour je pourrais revenir et faire de la recherche dans mon « chez moi » très cher.

SOMMAIRE

PUBLICATION :	1
COMMUNICATIONS:	1
ABREVIATIONS	2
INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX	4
INTRODUCTION GENERALE	8
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	10
1- La cocaïne	10
1- 1 Généralités	10
1- 1- 1 Historique	10
1- 1- 2 Structure et pharmacocinétique	11
1- 1- 3 Modes de consommation et prévalence	12
1- 2 Effets psychiques et somatiques.....	13
1- 2- 1 Au cours de sa consommation	13
1- 2- 2 Au cours du sevrage.....	15
1- 3 Mécanismes d'action.....	17
1- 3- 1 Cibles moléculaires.....	17
1- 3- 2 Importance des systèmes dopaminergiques	18
1- 3- 3 Cocaïne et neuroadaptations cérébrales	19
1- 4 L'anxiété, un des facteurs de vulnérabilité à la consommation de cocaïne	27
1- 4- 1 Facteurs individuels	27
1- 4- 2 Facteurs environnementaux	28
2- L'anxiété	31
2- 1 Généralités	31
2- 1- 1 Définition.....	31
2- 1- 2 Anxiété normale et pathologique	31

SOMMAIRE

2- 1- 3 Prévalence et comorbidité des troubles anxieux	33
2- 2 L'anxiété chez les rongeurs.....	33
2- 2- 1 Modélisation des symptômes anxieux chez le rongeur.....	33
2- 2- 2 Tests et modèles d'anxiété chez le rongeur	34
2- 3 Bases neurobiologiques de l'anxiété normale et pathologique	36
OBJECTIF GENERAL DE LA THESE.....	43
MATERIELS ET METHODES.....	45
1- Animaux.....	45
2- Traitements pharmacologiques.....	45
2- 1 Agents pharmacologiques	45
2- 2 Traitement chronique à la cocaïne	45
2- 3 Administration intracérébrale de muscimol	46
2- 3-1 Implantation des canules intracérébrales	46
2- 3-2 Procédure de microinjection	47
2- 3-3 Contrôle histologique du site d'injection.....	48
3- Evaluation comportementale	48
3- 1 Tests pour évaluer l'état anxieux des rats	48
3- 1- 1 Le labyrinthe en croix surélevé (EPM).....	48
3- 1- 2 Le confinement dans un bras ouvert (OA).....	49
3- 1- 3 Le test d'enfouissement défensif	50
3- 2 Tests pour évaluer l'état pseudo-dépressif des rats	51
3- 2- 1 Le test de la nage forcée	51
3- 2- 2 Le test de la consommation d'eau sucrée	52
4- Neuroanatomie	53
4- 1 Perfusion des animaux	54
4- 2 Immunohistochimie	54

4- 2- 1 Principe général	54
4- 2- 2 Immunohistochimie des protéines Fos et Zif-268	55
4- 2- 3 Double marquage des protéines NeuN/GFAP	56
4- 2- 4 Doubles marquage Fos/ARNm vGlut 1et Fos/ARNm GAD	56
4- 2- 5 Montage et coloration des coupes.....	57
4- 2- 6 Analyse des coupes et quantification.....	57
5- Analyses statistiques	58
TRAVAIL EXPERIMENTAL	60
Chapitre I : Evolution des comportements anxio-dépressifs chez les rats au cours d'un sevrage à la cocaïne	60
1- Introduction.....	60
2- Résultats.....	60
2- 1 Déroulement des expériences.....	60
2- 2 Evaluation du comportement anxieux.....	61
2- 3 Evaluation du comportement pseudo-dépressif	64
3- Discussion	66
3- 1 Effet d'un sevrage à la cocaïne sur l'état anxieux des animaux.....	66
3- 2 Effet d'un sevrage à la cocaïne sur l'état pseudo-dépressif des animaux	70
3- 3 Conclusion générale	71
Chapitre II : Corrélats neuroanatomiques de l'anxiété pathologique induite par un sevrage à la cocaïne	72
1- Introduction.....	72
2- Résultats.....	72
2- 1 Déroulement des expériences.....	72
2- 2 Comparaison des patterns d'induction de Fos après confinement dans l'OA chez les deux groupes de rats.....	75
2- 3 Comparaison des patterns d'induction de Zif-268 après confinement dans l'OA chez les deux groupes de rats	78

SOMMAIRE

3- Discussion	79
3- 1 Choix des marqueurs d'activation neuronale, les protéines Fos et Zif-268	79
3- 2 Discussion des résultats obtenus	80
3- 3 Discussion générale.....	88
Chapitre III : Importance du CPFm dans l'expression de l'état anxieux au cours du sevrage ?	89
1- Introduction	89
2- Résultats	89
2- 1 Phénotype des neurones activés par une exposition à l'OA et impact d'un traitement chronique à la cocaïne sur la densité neuronale et gliale dans le CPFm	89
2- 2 Déroulement des expériences d'injections locales de muscimol	91
2- 3 Effets d'injections de muscimol dans le dCPFm sur le comportement des rats confinés dans l'OA	91
2- 4 Vérification de l'étendue des injections de muscimol	93
3- Discussion	94
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	98
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	102
ANNEXES.....	119

PUBLICATION :

El Hage C., Rappeneau V., Etievant A., Morel A-L., Scarna H., Zimmer L., Bérode A. Neurobiological correlates of enhanced anxiety observed in cocaine withdrawn rats (Accepté avec modifications dans la revue PlosOne).

COMMUNICATIONS:

El Hage C., Morel A.L., Luppi P.H., Bérode A. Neurobiological correlates of cocaine-induced anxiety in withdrawn rats. Workshop de l'European College of Neuropsychopharmacology (ECNP), Nice, France, 2012.

El Hage C., Morel A.L., Luppi P.H., Bérode A. Neurobiological correlates of cocaine-induced anxiety in withdrawn rats. Society for Neurosciences (SfN) Anxiety and Depression 21st Neuropharmacology Conference, Washington DC, Etats-Unis, 2011.

El Hage C., Morel A.L., Zimmer L., Bérode A. Disruption in ability to cope with anxiogenic environments is associated with impaired reactivity of the medial prefrontal cortex in cocaine withdrawn rats. Congrès de la Société française de Pharmacologie et Thérapeutique (SFPT), Grenoble, France, 2011.

El Hage C., Morel A.L., Zimmer L., Bérode A. Disruption in ability to cope with anxiogenic environments is associated with impaired reactivity of the medial prefrontal cortex in cocaine withdrawn rats. Congrès de la Fédération Européenne des Neurosciences (FENS), Amsterdam, Hollande, 2010.

ABREVIATIONS

ATV	Aire tegmentale ventrale
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BNST	Noyau de la strie terminale
CPFm	Cortex préfrontal médian
DA	Dopamine
DAB	3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride
DAT	Transporteur membranaire de la dopamine
dCPFm	Partie dorsale du cortex préfrontal médian
DSM-IV	Quatrième version du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles Mentaux
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EPM	Labyrinthe en croix surélevé
GAD	Glutamate décarboxylase
GFAP	Protéine gliale fibrillaire acide
HAB	Rats ayant un trait hyper-anxieux
IRMf	Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
LAB	Rats ayant un trait hypo-anxieux
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
NAC	Noyau accumbens
NBT	Chlorure de nitrobleu de tétrazolium
NeuN	Marqueur nucléaire des neurones
NET	Transporteur membranaire de la noradrénaline
OA	Bras ouvert surélevé
OEDT	Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies
ONU	Organisation des Nation Unies

ABREVIATIONS

PAG	Substance grise périaqueducule
PB	Tampon phosphate
PBST	Tampon phosphate salin Triton X-100
PVT	Noyau paraventriculaire du thalamus
SERT	Transporteur membranaire de la sérotonine
SSC	Citrate de sodium salin
THC	Delta-9 tétra-hydrocannabinol
TOC	Troubles obsessionnels et compulsifs
vCPFm	Partie ventrale du cortex préfrontal médian
vGlut1	Transporteur vésiculaire du glutamate de type 1
6-OH-DA	6-hydroxydopamine

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Rappels bibliographiques

Figure 1 : Photographies illustrant de gauche à droite : l'arbuste *Erythroxylon Coca*, une publicité pour le vin Mariani et des cristaux de chlorhydrate de cocaïne.

Figure 2 : Structure moléculaire de la cocaïne.

Figure 3 : Différents modes de consommation de la cocaïne.

Figure 4 : Coupe sagittale de cerveau schématisant les deux principales voies de projection dopaminergiques : la voie nigrostriée et la voie mésocorticolimbique.

Figure 5 : Formes de neuroplasticité moléculaire associées aux périodes de consommation de cocaïne ou d'abstinence.

Figure 6 : Mécanismes de régulations transcriptionnel et épigénétique impliqués dans les neuroplasticités induites par les drogues, d'après Robinson et Nestler 2011.

Figure 7 : Structures cérébrales impliquées dans les différentes étapes du processus anxieux.

Tableau 1 : Affinités de différents psychostimulants pour les transporteurs membranaires des monoamines d'après la revue de Howell et Kimmel (2008).

Tableau 2 : Représentation des différents tests et modèles d'anxiété développés chez les rongeurs d'après la revue de Sartori et al., (2011).

Tableau 3 : Modifications fonctionnelles cérébrales observées dans les différentes pathologies anxieuses d'après la revue de Shin et Liberzon (2010).

Matériels et méthodes

Figure 8 : Photographie représentant un rat dans sa cage d'hébergement après l'implantation intracérébrale de canules.

Figure 9 : Le labyrinthe en croix surélevé (EPM) à gauche et le confinement dans l'un des bras ouvert de ce labyrinthe (OA) à droite.

Figure 10 : Cage comportant une sonde électrifiée pour le test de d'enfouissement défensif.

Figure 11 : Le test de la nage forcée.

Figure 12 : Cage avec libre accès à deux biberons l'un contenant de l'eau, l'autre une solution de saccharose pour le test de la consommation d'eau sucrée.

Figure 13 : Représentation générale du principe de révélation avec le complexe avidine-biotine.

Travail expérimental

Figure 14 : Protocole expérimental (Chapitre 1).

Figure 15 : Comportements exploratoires observés dans le labyrinthe en croix surélevé à 2 jours de sevrage.

Figure 16 : Comportements exploratoires observés dans le bras ouvert à 2 et 8 jours de sevrage.

Figure 17 : Comportements observés dans le test d'enfouissement défensif à 2, 7 et 28 jours de sevrage.

Figure 18 : Comportements observés dans le test de la nage forcée à 2 et 15 jours de sevrage

Figure 19 : Evaluation de la consommation d'une solution de saccharose.

Figure 20 : Protocole expérimental (Chapitre 2).

Figure 21 : Diagrammes, adaptés de l'atlas Paxinos et Watson (1998), indiquant l'emplacement des zones utilisées pour la quantification des cellules exprimant les protéines Fos.

Figure 22 : Effet de deux jours de sevrage à la cocaïne sur l'expression de Fos dans les régions corticales après confinement des rats dans l'OA.

Figure 23 : Effet de deux jours de sevrage à la cocaïne sur l'expression de Fos dans les régions sous-corticales après confinement des rats dans l'OA.

Figure 24 : Effet de deux jours de sevrage à la cocaïne sur l'expression de Zif-268 dans le dCPFM après confinement des rats dans l'OA.

Figure 25 : Effet de deux jours de sevrage à la cocaïne sur l'expression de Zif-268 dans différents noyaux de l'amygdale après confinement des rats dans l'OA.

Figure 26 : Microphotographies illustrant la distribution des cellules exprimant Fos dans le cortex cingulaire antérieur.

Figure 27 : Microphotographies illustrant la distribution des cellules exprimant Fos dans le gyrus denté dorsal (à gauche) et le subiculum ventral (à droite).

Figure 28 : Microphotographies illustrant la distribution des cellules exprimant Fos dans la PAG dorsolatérale (à gauche) et ventrolatérale (à droite).

Figure 29 : Microphotographies montrant les cellules doublement marquées dans le cortex cingulaire antérieur.

Figure 30 : Protocole expérimental (Chapitre 3).

Figure 31 : Effets de l'injection de muscimol dans le CPFm dorsal sur les comportements anxieux dans l'OA.

Figure 32 : Microphotographie d'une coupe immunomarquée avec la protéine Fos et illustrant l'étendue d'une injection de 100 ng de muscimol dans le dCPFm.

Tableau 4 : Densités des neurones et des cellules gliales, et proportions des cellules exprimant Fos et l'ARNm de GAD ou Fos et l'ARNm de vGlut1 dans le CPFm.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

L'usage abusif ou addictif de drogues, qu'elles soient licites comme l'alcool ou le tabac, ou illicites comme l'héroïne ou les psychostimulants (cocaïne, ecstasy, amphétamines) est souvent accompagné de troubles psychiatriques (schizophrénie, troubles de l'humeur, troubles anxieux, troubles de la personnalité,...) (Fenton *et al*, 2012; Kellogg *et al*, 2002; Kessler *et al*, 2005; Swendsen *et al*, 2010). La co-occurrence chez un même individu d'un trouble lié à la consommation de drogues et d'un autre trouble psychiatrique entraîne une aggravation du pronostic, une plus grande difficulté dans la prise en charge et des conséquences plus graves sur le plan socioprofessionnel et relationnel.

Les données épidémiologiques indiquent une forte prévalence des troubles anxieux chez les personnes consommant de la cocaïne (Bolton *et al*, 2006; Jacobsen *et al*, 2001) et suggèrent l'existence d'interactions entre consommation de ce psychostimulant et anxiété pathologique. Plusieurs hypothèses, non exclusives, ont été émises pour tenter d'expliquer cette comorbidité : les troubles anxieux observés pourraient être induits ou aggravés par la consommation de cocaïne, les troubles anxieux pourraient inciter à la consommation de cocaïne comme tentative d'automédication, l'expression de ces deux pathologies pourrait refléter une vulnérabilité partagée. En effet, l'anxiété est non seulement un symptôme observé lors de l'arrêt de la consommation de cocaïne mais également un facteur important dans sa reprise ou dans le déclenchement de la rechute après une période d'abstinence. De plus, l'anxiété est également susceptible de potentialiser l'effet d'autres facteurs sur la prise de cocaïne, comme l'effet des indices environnementaux rappelant la prise de drogues. Les mécanismes neurobiologiques sous-tendant ces interactions ne sont pas connus et leur compréhension permettrait de proposer des stratégies thérapeutiques plus efficaces pour le traitement des personnes présentant ces comorbidités psychiatrique et addictive.

Dans cette étude, réalisée chez le rat, nous nous sommes intéressés aux conséquences d'une exposition répétée à la cocaïne sur l'expression d'états anxieux au cours d'une période de sevrage courte et prolongée, pour ensuite porter une attention particulière aux substrats neuronaux qui sous-tendent l'expression de cet état émotionnel. Pour traiter ce sujet, il nous est apparu indispensable de rappeler les principales données sur les effets comportementaux et neurobiologiques de la cocaïne d'une part et la physiopathologie des troubles anxieux d'autre part, et ceci à la fois chez l'homme et chez l'animal.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

1- La cocaïne

1- 1 Généralités

1- 1- 1 Historique

La cocaïne est un alcaloïde extrait de la feuille de coca. Il existe au moins quatre espèces d'arbustes à coca dont le plus commun est *Erythroxylon Coca*. Ces arbustes restent concentrés dans trois pays de la région des Andes : la Colombie, le Pérou et la Bolivie. Bien que poussant à l'état sauvage, l'arbuste à coca est cultivé, généralement entre 500 et 1500 m d'altitude en climat humide. La feuille de coca contient plusieurs alcaloïdes dont l'un est la cocaïne.

L'usage de la feuille de coca remonte à la plus haute antiquité. Les découvertes archéologiques témoignent de l'usage de la coca en Amérique du Sud, 3000 ans avant J.C. Chez les Incas, initialement réservée aux prêtres et aux castes élevées pour les rituels sacrés, la coca a rapidement gagné toutes les couches de la population. Les feuilles de coca sont consommées sous forme d'une chique que l'on mastique pendant quelques heures. L'appareil digestif est anesthésié, l'usager ne ressent plus la faim. Cette consommation permettait aussi de se protéger du froid et de l'altitude.



Figure 1 : Photographies illustrant de gauche à droite : l'arbuste *Erythroxylon Coca*, une publicité pour le vin Mariani et des cristaux de chlorhydrate de cocaïne.

Introduite en Europe peu après la conquête du Pérou, la feuille de coca est employée par les médecins en infusion et décoction pour de nombreux traitements. Le chimiste allemand, Friedrich Gaedcke, est le premier en 1855 à avoir isolé des cristaux contenus dans la feuille de coca. Il nomme cette substance *Erythroxyline*. C'est en 1860 à Vienne qu'un étudiant en chimie, Albert Niemann, identifie pour la première fois le principe actif des feuilles de coca, la cocaïne, et en décrit l'action anesthésique. Trois ans plus tard, Lossen en détermine la formule chimique. En 1863, le vin Mariani – une boisson tonifiante – contenant des infusions de feuilles de coca est commercialisé et assimilé à un médicament contre la grippe, l'anémie ou la dépression. En 1885, le pharmacien américain Pemberton inventa une boisson à base de feuilles de coca, le Coca-Cola ®, qui contiendra de l'extrait de coca jusqu'au début du siècle.

La cocaïne a été longtemps utilisée en thérapeutique pour l'anesthésie des tissus profonds et les anesthésies locales. La prescription médicale de cocaïne se développe rapidement, comme anesthésiant, comme tonifiant, voire comme traitement de désintoxication à l'opium, à la morphine et à l'alcool. Mais dès 1885, certains spécialistes, dont le toxicologue Louis Lewin, commencent à décrire les effets néfastes de la cocaïne. Les premiers cas de dépendance ont également été décrits à cette époque. En 1914, les états américains ont réglementé l'usage et la distribution de cocaïne par l'adoption du "Harrison Act", pour réduire la criminalité et en interdire peu à peu l'usage non-médical. En 1961, l'Organisation des Nations Unies (ONU) a convoqué la **convention unique sur les stupéfiants** dont l'objectif est de limiter la production et le commerce des stupéfiants dont la cocaïne.

En 1993, l'Observatoire Européen des Drogues et des Toxicomanies (OEDT) est créé pour apporter « des informations objectives, fiables et comparables au niveau européen sur le phénomène des drogues, des toxicomanies et leurs conséquences ». Aujourd'hui, malgré les restrictions à son utilisation, la cocaïne reste la deuxième drogue illicite la plus expérimentée en Europe après le cannabis (Rapport OEDT 2011).

1- 1- 2 Structure et pharmacocinétique

La cocaïne ou benzoylecgonine fait partie de la famille des alcaloïdes. Sa formule chimique brute est la suivante : $C_{17}H_{21}NO_4$ et sa structure moléculaire est représentée dans la figure 2.

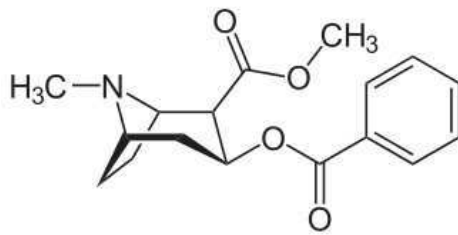


Figure 2 : Structure moléculaire de la cocaïne

La distribution de la cocaïne dans l'organisme se fait de manière très rapide, notamment vers le cerveau puisqu'elle passe très facilement la barrière hémato-encéphalique. Suite à une injection intraveineuse, la cocaïne atteint des concentrations maximales dans le cerveau en moins de 10 minutes. Les taux cérébraux diminuent ensuite rapidement (Fowler *et al*, 1992, 2001).

La cocaïne est une molécule rapidement dégradée dans l'organisme sous l'action des cholinestérases plasmatique et hépatique. Sa demi-vie dans le plasma est estimée à environ une heure, ce qui explique ses effets relativement brefs (Fowler *et al*, 1992). Ses deux principaux métabolites, la benzoylecgonine et l'ecgonine méthyl ester, sont retrouvés dans l'urine et sont considérés comme des marqueurs de son utilisation.

1- 1- 3 Modes de consommation et prévalence

La cocaïne peut être consommée sous plusieurs formes. La plupart des consommateurs de cocaïne déclarent l'inhaler sous forme de poudre (chlorhydrate de cocaïne) ou la fumer après transformation en cocaïne base (« free base » ou « crack »). On observe cependant une grande diversité entre les consommateurs. Les usagers occasionnels, souvent mieux intégrés socialement, sniffent généralement de la poudre alors que les usagers marginaux et souvent dépendants s'injectent de la cocaïne ou prennent du crack. Du fait de son action et de sa vitesse d'élimination rapides, la cocaïne est généralement consommée de façon répétitive et rapprochée (Johanson and Fischman, 1989). Son usage varie selon les individus allant d'une consommation récréative et contrôlée à une consommation compulsive (voir § 1- 2 Effets psychotropes et somatiques).

On estime à environ 14,5 millions le nombre d'européens qui ont consommé au moins une fois dans leur vie de la cocaïne, soit en moyenne 4,3 % d'adultes âgés de 15 à 64 ans. Les

estimations de la prévalence de la consommation de cocaïne sont plus basses en Europe (2,1 %) qu'en Australie (3,4 %), au Canada (3,3 %) ou aux Etats-Unis (4,1 %) bien que ces niveaux varient considérablement d'un pays à un autre. L'Irlande, l'Espagne, l'Italie, Chypre et le Royaume-Uni déclarent des niveaux de consommation supérieurs à la moyenne européenne (Rapport de l'OEDT 2011). En Europe, la disponibilité et la baisse du prix du produit la rendent accessible à toutes les classes sociales ; son usage ne concerne donc plus seulement une « élite » fortunée.

1- 2 Effets psychiques et somatiques

1- 2- 1 Au cours de sa consommation

→ En aigu

La cocaïne possède de fortes propriétés stimulantes. **Chez l'homme**, sa consommation induit un état d'euphorie immédiat et un accroissement de la vigilance. Cette phase d'excitation psychique dure environ une heure et s'accompagne d'un sentiment subjectif de puissance intellectuelle et physique se traduisant notamment par une forte acuité mentale, mais aussi une diminution de la sensation de fatigue, du sommeil et de l'appétit. Cette phase est dite de « rush » ou de « flash » (Gawin, 1991). En outre, des symptômes physiques tels que l'accélération du rythme cardiaque et respiratoire ou l'élévation de la pression artérielle sont également constatés.

Chez les rongeurs, les propriétés stimulantes de la cocaïne ont surtout été étudiées par des mesures comportementales. Une administration aiguë de cocaïne induit une hyperactivité locomotrice et, à forte dose, l'apparition de stéréotypies (comportements répétitifs de faibles amplitudes sans motivation apparente tels que des hochements de tête et des reniflements) (Flagel and Robinson, 2007; Johanson and Fischman, 1989). Les effets « appétitifs » et renforçants de la cocaïne, quant à eux, peuvent être évalués par le test de préférence de place conditionnée (association des effets plaisants de la cocaïne à un environnement précis) ou des modèles expérimentaux d'auto-administration (comportement actif de l'animal dans le but de se procurer de la cocaïne).

→ En chronique

Chez l'homme, l'usage de drogues évolue progressivement et plus ou moins rapidement selon les personnes, allant de la prise occasionnelle et récréative à une consommation compulsive et abusive pouvant aboutir à la dépendance (Figure 3). En effet, parmi les personnes ayant expérimenté la cocaïne, seule une partie estimée à 16 à 20 % devient dépendante (Wagner and Anthony, 2002). Selon les critères diagnostiques établis par l'Association Américaine de Psychiatrie, l'addiction ou pharmacodépendance se caractérise par une envie irrépessible de drogues et aboutit à une perte de contrôle de sa consommation (quatrième version du Manuel Diagnostique et Statistique des troubles mentaux ou DSM-IV). Ce comportement pathologique a les caractéristiques d'une maladie chronique, puisque même après une période prolongée d'abstinence la rechute est fréquente.

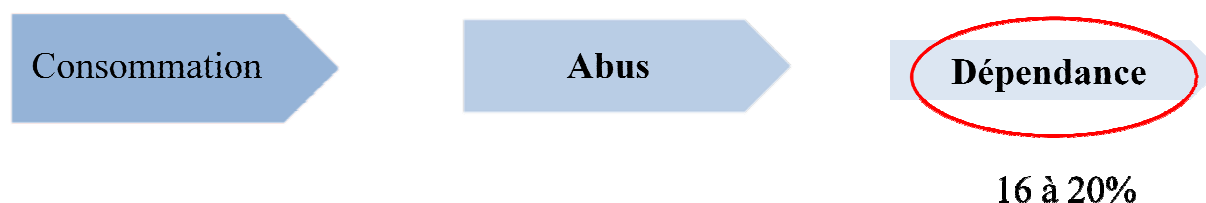


Figure 3 : Différents modes de consommation de la cocaïne.

Le passage d'un état contrôlé à un état compulsif de prise de drogues est considéré comme étant le résultat d'une interaction entre un individu vulnérable et un environnement prédisposant (Enoch, 2006). Trois facteurs essentiels contribuent à la détermination de la vulnérabilité à développer l'addiction : les effets psychiques induits par la cocaïne (effets de la cocaïne au cours de sa consommation), les facteurs individuels de vulnérabilité (génétiques, psychologiques,...) et les facteurs environnementaux (conditions de vie de l'individu) (voir § 1- 4 Facteurs de vulnérabilité à la consommation de cocaïne).

L'usage chronique de cocaïne est associé à des perturbations diverses : des accidents cérébro-vasculaires (Levine *et al*, 1987), une toxicité pulmonaire et hépatique (Roth *et al*, 1992) et des troubles cognitifs (attention, mémoire de travail, planification,...) (Madoz-Gúrpide *et al*, 2011).

L'addiction étant définie par l'usage compulsif de drogues en dépit des effets nocifs qu'il induit, différents modèles animaux ont été développés pour modéliser cet aspect de la consommation (Deroche-Gamonet *et al*, 2004; Vanderschuren and Everitt, 2004). **Chez les rongeurs** ayant eu la possibilité de s'auto-administrer la cocaïne pendant de longues périodes, le comportement addictif s'évalue par la présence des trois critères suivants : la perte de contrôle (maintien du comportement de recherche de la drogue même si cette dernière n'est plus délivrée), la forte motivation à consommer (capacité de l'animal à fournir un effort important pour obtenir la drogue) et une consommation continue en dépit des conséquences néfastes (administration de cocaïne associée à un choc électrique délivré dans les pattes, par exemple). Il est intéressant de noter que, sur la base de ces critères, environ 20 % d'une population de rats appartenant à une même souche développe un comportement apparenté à la dépendance (Deroche-Gamonet *et al*, 2004; Kasanetz *et al*, 2010) ce qui reproduit la proportion observée chez l'homme.

L'administration répétée de cocaïne induit une augmentation progressive de la réponse motrice à une même dose de drogue au fur et à mesure des injections. Ce phénomène est nommé « sensibilisation comportementale » (Post *et al*, 1987). Il se maintient pendant des mois, même en l'absence de nouvelle exposition aux psychostimulants, et dépend de la dose de cocaïne à laquelle l'animal a été exposé (Kalivas and Duffy, 1993; Samaha *et al*, 2002). Cette sensibilisation comportementale reflète la mise en place de neuroadaptations cérébrales durables et serait associée à un accroissement de la motivation pour la drogue (Vezina, 2004).

1- 2- 2 Au cours du sevrage

L'arrêt de la prise de cocaïne ne produit pas de symptômes physiques marqués, mais peut faire apparaître des symptômes psychiques dont l'évolution varie au cours de la période de sevrage. **Chez l'homme**, les observations cliniques ont permis de décrire trois phases dans la symptomatologie de la période d'abstinence (Gawin and Kleber, 1986; Gawin, 1991):

- la première phase ou « crash » se définit par une phase d'effondrement dépressif avec manifestations d'un état anxieux, de sensations de fatigue et de sommeil. Le recours aux opiacés, sédatifs, alcool ou cannabis pour atténuer cet état est fréquent. Cette phase peut durer plusieurs jours.

- la deuxième phase qui peut se prolonger pendant plusieurs semaines est marquée par un état d'anhédonie, un manque de motivation et une forte anxiété.
- la troisième phase est une période qui se caractérise par une stabilisation de l'humeur et des émotions mais elle peut être marquée par des envies épisodiques et irrépessibles de drogues déclenchées par un stress ou par les indices environnementaux préalablement associés à la prise de drogues. Cette envie irrépessible peut survenir même après des années d'arrêt de consommation de la drogue.

Les symptômes de sevrage à la cocaïne **chez les rongeurs** présentent des homologies avec ce qui est observé chez l'homme (anxiété, anhédonie, troubles du sommeil,...).

Une augmentation du niveau d'anxiété a été mise en évidence dès la première heure qui suit l'administration aiguë ou chronique de cocaïne chez le rat, et ceci dans plusieurs paradigmes expérimentaux : le labyrinthe en croix surélevé (EPM) (Paine *et al*, 2002; Perrine *et al*, 2008), le test d'enfouissement défensif (Aujla *et al*, 2008; Basso *et al*, 1999) ou le test de « l'open field » (Yang *et al*, 1992). Il a également été montré qu'un stimulus aversif, comme l'envoi de bouffées d'air sur le museau des rats lors d'un sevrage à la cocaïne, induit l'émission de vocalisations ultrasoniques qui peut être interprétée comme un signe d'anxiété ; ces vocalisations cessent lorsque l'animal a la possibilité de consommer de la drogue et sont absentes chez les rats témoins (Covington and Miczek, 2003).

De même, des données expérimentales indiquent l'apparition d'un état anhédonique pendant la période de sevrage chez des rats exposés à la cocaïne. Ainsi, plusieurs équipes rapportent que les rats qui ont eu la possibilité de s'auto-administrer de la cocaïne ou un autre psychostimulant de façon prolongée montrent une augmentation de leur seuil d'autostimulation intracérébrale (c'est-à-dire une diminution de leur sensibilité à la valeur récompensante de cette stimulation) jusqu'à 48 heures après l'exposition à la drogue (Amitai *et al*, 2009; D'Souza and Markou, 2010). De plus, l'administration quotidienne de fortes doses de cocaïne réduit la préférence des rats pour un environnement associé à un nouvel objet, jusqu'à 5 semaines après l'arrêt du traitement, suggérant aussi l'induction d'un état anhédonique durable (Harris *et al*, 2007).

1- 3 Mécanismes d'action

1- 3- 1 Cibles moléculaires

La cocaïne a pour cibles primaires les transporteurs membranaires des monoamines : le transporteur membranaire de la dopamine (DA) ou DAT, de la noradrénaline ou NET et de la sérotonine ou SERT. A la différence des autres psychostimulants, comme l'amphétamine, la méthamphétamine et le méthylphénidate qui ont une plus faible affinité pour les transporteurs de la sérotonine, la cocaïne se lie avec une affinité comparable à ces différents transporteurs (Tableau 1).

Drug	Dopamine	Sérotonin	Norepinephrine
(-) Cocaine	478 ^a	304 ^a	779 ^b
(+) Amphetamine	34 ^b	3830 ^b	39 ^b
(+) Methamphetamine	114 ^c	2137 ^c	48 ^c
(±) Methylphenidate	82 ^d	7600 ^d	440 ^d

^a IC₅₀ (nM): Matecka et al. (1996), J Med Chem 39:4704-16.
^b Ki (nM): Rothman et al. (2001), Synapse 39:32-41.
^c Ki (nM): Rothman et al. (2000), Synapse 35:222-7.
^d IC₅₀ (nM): Pan et al. (1994), Eur J Pharmacol 264:177-82.

Tableau 1 : Affinités de différents psychostimulants pour les transporteurs membranaires des monoamines d'après la revue de Howell et Kimmel (2008).

La cocaïne, en se liant à ces transporteurs, bloque la recapture des trois monoamines après leur libération et augmente leurs concentrations extracellulaires au niveau synaptique et somato-dendritique (Kuhar *et al*, 1991). Les études chez le rat montrent que l'injection de cocaïne provoque une forte augmentation des taux extracellulaires de DA et de sérotonine dans le striatum, le noyau accumbens (NAC), le cortex préfrontal et l'aire tegmentale ventrale (ATV) (Chen and Reith, 1993; Imperato *et al*, 1992; Kalivas and Duffy, 1993; Shimamoto *et al*, 2011) et de noradrénaline dans le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'ATV (Florin *et al*, 1994).

Il faut noter que l'augmentation de la transmission monoaminergique, après exposition à la cocaïne, est d'autant plus forte que l'activité de base des neurones est élevée; elle est donc dépendante de l'activité présynaptique (Howell and Kimmel, 2008).

Dans le paragraphe qui suit, nous nous focaliserons sur les systèmes dopaminergiques puisqu'ils jouent un rôle prépondérant dans les effets psychostimulants et addictifs de la cocaïne, même si divers arguments expérimentaux plaident en faveur d'une modulation de leurs effets par les systèmes sérotoninergique et noradrénergique.

1- 3- 2 Importance des systèmes dopaminergiques

Les études pharmacologiques ont démontré l'importance des deux principales classes de récepteurs dopaminergiques D1 et D2 dans les effets stimulants et renforçants de la cocaïne (Barrett *et al*, 2004; Ushijima *et al*, 1995). Plus récemment, l'utilisation de souris possédant un DAT fonctionnel mais ne liant pas la cocaïne a confirmé le rôle essentiel de ce transporteur membranaire dans le comportement d'auto-administration de cocaïne et de préférence de place conditionnée (Chen *et al*, 2006; Thomsen *et al*, 2009).

Les deux principaux systèmes dopaminergiques impliqués dans l'effet des drogues sont les systèmes dopaminergiques mésolimbique et nigrostrié.

Le système dopaminergique mésolimbique, dont les corps cellulaires sont localisés dans l'ATV, innerve plusieurs structures sous-corticales de la sphère limbique, telles que le NAC, les tubercules olfactifs, le complexe amygdalien et le septum (Figure 4). Il joue un rôle particulièrement important dans les processus de récompense associés aux activités naturelles et aux drogues (Di Chiara *et al*, 1993; Ikemoto, 2007, 2010; Wise and Bozarth, 1987). Cependant à la différence des récompenses naturelles, les drogues induisent une libération de DA plus importante et plus prolongée (Wolf, 2002) et n'engendrent pas d'habituation ou d'adaptation à la réponse (Di Chiara, 1999).

Ce système mésolimbique constitue un substrat activé par la majorité des drogues (amphétamine, morphine, cocaïne, alcool ou nicotine) malgré la disparité de leurs mécanismes d'action (Di Chiara and Imperato, 1988; Di Chiara *et al*, 2004). La déplétion en DA dans le NAC par exemple, atténue fortement le comportement d'auto-administration de psychostimulants (Lyness *et al*, 1979; Roberts *et al*, 1980). Plus récemment, Ikemoto et al. ont souligné l'hétérogénéité de ce système en montrant que la partie postéro-médiale de l'ATV, projetant sur la partie médiale de la partie shell du NAC et des tubercules olfactifs, est plus impliquée dans les processus de récompense que la partie latérale projetant sur le core du NAC et les parties latérales du shell et des tubercules olfactifs (Ikemoto, 2007).

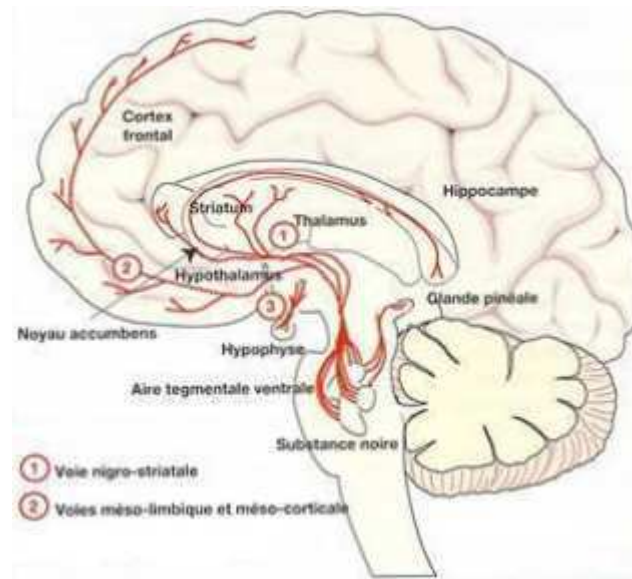


Figure 4 : Coupe sagittale de cerveau schématisant les deux principales voies de projection dopaminergiques : la voie nigrostriée et la voie mésocorticolimbique.

La voie dopaminergique nigrostriée, reliant la substance noire compacte au striatum (Figure 4), quant à elle, interviendrait plutôt dans les apprentissages liés aux habitudes qui pourraient induire des comportements compulsifs de prise de drogues (Vanderschuren *et al*, 2005).

1- 3- 3 Cocaïne et neuroadaptations cérébrales

Etudes de neuroimagerie chez l'homme

Les études de neuroimagerie fonctionnelle chez les usagers de cocaïne ont permis d'observer un certain nombre d'anomalies cérébrales dont une diminution de volume du CPFm (Franklin *et al*, 2002; Makris *et al*, 2004), une diminution de la matière grise dans le cortex orbito-frontal médian (Tanabe *et al*, 2009) ainsi qu'une diminution de la transmission dopaminergique, du métabolisme cellulaire et du flux sanguin dans le cortex cingulaire et orbito-frontal au cours du sevrage (Goldstein and Volkow, 2002; Rogers and Robbins, 2001). Il a été suggéré que ces altérations au niveau cortical seraient en lien avec l'incapacité des sujets dépendants à contrôler leurs comportements compulsifs de consommation de drogues (Goldstein and Volkow, 2011).

Des altérations ont également été observées au niveau des structures du système limbique, telles que l'amygdale, le thalamus et l'hippocampe (Goussakov *et al*, 2006; Gozzi *et al*, 2011; Makris *et al*, 2004; Tomasi *et al*, 2007).

Ces études ne permettent cependant pas de savoir si ces altérations sont une cause ou une conséquence de l'exposition à la drogue d'où le recours à des modèles animaux qui permettent de mieux d'étudier les neuroadaptations induites par la prise de cocaïne et donc les conséquences directes à son exposition.

Neuroadaptations cérébrales induites par la cocaïne chez l'animal

L'exposition répétée à la cocaïne, en stimulant de façon soutenue la transmission monoaminergique, déclenche la mise en place de neuroadaptations cérébrales dans les systèmes monoaminergiques et les régions cérébrales qu'ils innervent. Ces neuroadaptations s'appuient sur des modifications de l'expression génique, du traitement post-traductionnel des protéines, de l'excitabilité membranaire (plasticité synaptique) et de la réorganisation fonctionnelle de certains circuits neuronaux (Kalivas and O'Brien, 2008; Robison and Nestler, 2011). Elles sont à la base des effets à long terme de ce psychostimulant.

i. Modifications géniques : Facteurs de transcription à induction immédiate

La stimulation des neurones peut entraîner l'activation de deux mécanismes de signalisation différents : 1- l'activation électrique qui permet le traitement et la transmission de l'information de façon quasi-immédiate, 2- les cascades d'activation intracellulaire de seconds messagers (Bhat *et al*, 1992; Cole *et al*, 1992; Herdegen and Leah, 1998). Une classe de gènes activée par les seconds messagers est constituée par les gènes dits d'activation précoce (ou IEG pour Immediate Early Gene), parmi lesquels c-fos et zif-268 (encore dénommé erg-1 pour « early growth response protein 1 ») sont les mieux caractérisés.

Les protéines codées par ces gènes sont des facteurs de transcription qui en se liant soit directement à une séquence ADN consensus (comme Zif par exemple), soit à une protéine membre de la famille Jun pour former le complexe transcriptionnel AP-1 (Activation Protein - 1) (cas des protéines Fos) pourront modifier la réponse neuronale à plus ou moins long terme

en initiant la transcription et/ou la répression de gènes cibles (Hope *et al*, 1992; Morgan and Curran, 1991).

Différentes études ont montré l'importance des récepteurs dopaminergiques D1 dans l'induction de ces gènes par les psychostimulants. L'expression de la protéine Fos, par exemple, est augmentée de façon synergique par la stimulation des récepteurs D1 et D2, bien que l'activation des récepteurs D1 soit suffisante pour l'induire (Cole *et al*, 1992; Flagel and Robinson, 2007; Keefe and Gerfen, 1995). Des observations similaires ont été rapportées en ce qui concerne l'activation de Zif-268. En effet, son induction par la cocaïne est abolie par un des antagonistes des récepteurs D1, le SCH23390, ainsi que par la lésion des terminaisons dopaminergiques du striatum par la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Bhat *et al*, 1992; Cole *et al*, 1992).

L'administration de psychostimulants, comme la cocaïne et l'amphétamine, provoque l'induction des protéines Fos et Zif-268 dans le striatum, le NAC et le cortex préfrontal médian (CPFm), structures cibles des systèmes dopaminergiques mésocorticolimbique et nigrostriée (Graybiel *et al*, 1990; Hope *et al*, 1992; Jaber *et al*, 1995; Unal *et al*, 2009; Young *et al*, 1991). Cependant, bien que moins nombreuses, plusieurs études montrent que l'expression de Fos après administration ou prise de cocaïne s'étend à d'autres structures cérébrales comme le pallidum ventral, le complexe amygdalien, l'hypothalamus, les noyaux de la strie terminale (ou BNST), subthalamique et tegmental rostro-médial qui ne reçoivent que peu ou pas d'innervation dopaminergique (Zahm *et al*, 2010).

Lors d'administrations répétées de cocaïne, il a été rapporté une diminution ou désensibilisation de l'induction de Fos dans le striatum, le NAC et le cortex cingulaire et une sensibilisation dans le globus pallidus, la substance noire et l'ATV. L'induction de Fos dans l'amygdale et l'hypothalamus n'est pas affectée par un traitement chronique (Zahm *et al*, 2010). Cependant même si une désensibilisation à cette induction se développe au cours des expositions répétées dans certaines structures cérébrales, un simple stimulus tel que l'exposition à la drogue ou à un stress est susceptible d'induire de nouveau l'expression de ces protéines (Kalivas and O'Brien, 2008).

L'importance fonctionnelle de ces deux facteurs de transcription a été montrée par diverses approches. Les souris déficientes en la protéine Fos dans les neurones du NAC exprimant le

récepteur D1 montrent une sensibilisation comportementale à la cocaïne atténuée ainsi qu'une extinction retardée de la préférence de place conditionnée (Zhang *et al*, 2006). De même, l'injection d'oligonucléotides antisens bloquant l'expression de Zif-268 dans le noyau basolatéral de l'amygdale abolit la consolidation des mémoires appétitives associées à la cocaïne et réduit le comportement de recherche de cocaïne et la rechute (Lee *et al*, 2005). Les souris déficientes pour la protéine Zif-268 ne manifestent pas de préférence de place conditionnée à la cocaïne et leur sensibilisation comportementale à cette drogue est également réduite, suggérant un rôle important de ce facteur de transcription dans les effets stimulants et récompensants de la cocaïne (Valjent *et al*, 2006).

L'ensemble de ces résultats montre que l'activation de gènes d'activation précoce, comme c-fos et zif -268, représente une étape initiale importante dans l'induction des changements neuronaux liés à l'exposition ou la consommation de cocaïne.

ii. Modifications géniques : Facteur de transcription à induction lente et stable

Alors que l'expression des protéines Fos et Zif-268 est rapide, transitoire et sujette à une désensibilisation avec la chronicité du stimulus, d'autres facteurs de transcription comme delta Fos B sont induits plus tardivement mais de façon plus stable (Figure 5). La protéine delta Fos B est une variante tronquée de Fos-B résultant de l'épissage alternatif du gène codant pour cette protéine (McClung *et al*, 2004a). Cette protéine de demi-vie très longue s'accumule graduellement dans la cellule au cours des expositions répétées à la cocaïne et s'y maintient à un taux élevé même en l'absence de drogues (Bibb *et al*, 2001; Larson *et al*, 2010).

Des traitements chroniques à la cocaïne, mais aussi à la morphine, à l'alcool ou au delta-9 tétra-hydrocannabinol (ou THC) stimulent fortement son expression dans le complexe striatal et dans une moindre mesure au niveau du cortex préfrontal médian et de l'amygdale centrale et basolatérale (McClung *et al*, 2004a; Perrotti *et al*, 2008; Sato *et al*, 2011).

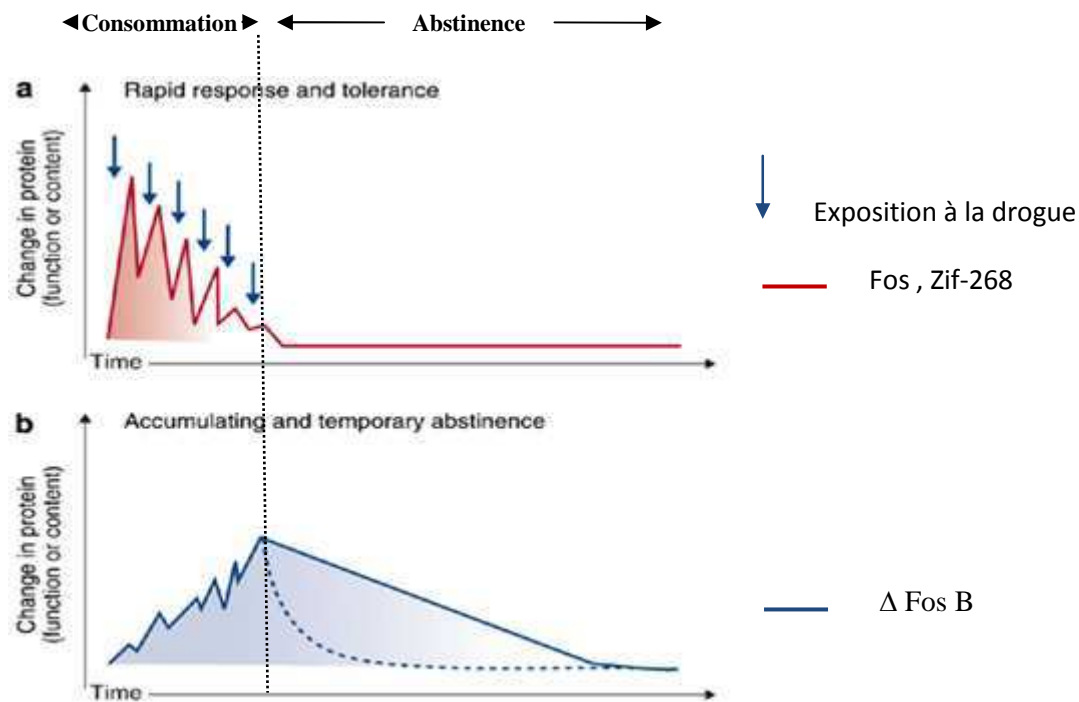


Figure 5 : Formes de neuroplasticité moléculaire associées aux périodes de consommation de cocaïne ou d'abstinence.

L'utilisation de souris génétiquement modifiées ont permis de démontrer l'importance fonctionnelle de ce facteur dans les comportements induits par l'exposition chronique à la cocaïne. Les souris dont le gène Fos B a été invalidé (ou souris knockout) ne montrent plus de préférence de place conditionnée à la cocaïne (Hiroi *et al*, 1997). A l'inverse, les souris transgéniques surexprimant la protéine delta Fos B dans les neurones du NAC et du striatum exprimant les récepteurs D1 manifestent une préférence de place conditionnée élevée à la cocaïne (Kelz *et al*, 1999), une grande motivation à se l'auto-administrer (Colby *et al*, 2003) et une plus grande sensibilité à ses effets psychomoteurs.

Ces données suggèrent, que la protéine delta Fos B comme les protéines Fos et Zif-268, participent au développement des neuroadaptations cérébrales favorisant la consommation de cocaïne.

iii. Modifications morphologiques

Des études conduites chez l'animal ont montré que les altérations observées au niveau moléculaire s'accompagnent de modifications morphologiques durables au niveau cellulaire. En particulier, l'exposition répétée à la cocaïne chez le rat augmente la densité et le nombre d'épines dendritiques des neurones dits épineux de la partie shell du NAC et de l'arbre dendritique des cellules pyramidales de la couche V du cortex préfrontal (Marie *et al*, 2012; Robinson and Kolb, 2004). Comme pour l'induction des protéines Fos et Zif-268 après injection de cocaïne, les récepteurs dopaminergiques de type D1 et D2 sont fortement impliqués dans ces altérations morphologiques. Dans le NAC, alors que ces changements morphologiques affectent initialement les neurones exprimant les récepteurs D1 et D2, ils ne persistent que dans la sous-population de neurones exprimant les récepteurs D1 (Lee *et al*, 2006; Ren *et al*, 2010). De plus il a été mis en évidence que les récepteurs glutamatergiques de type NMDA sont également impliqués dans ces neuroadaptations (Martin *et al*, 2011; Ren *et al*, 2010).

Bien que les mécanismes moléculaires sous-tendant ces modifications structurales soient encore mal compris, plusieurs facteurs contrôlant la transcription de gènes et la régulation de la chromatine ont été impliqués (Figure 6). Ils incluent la protéine delta Fos B et ses protéines cibles comme la kinase 5 cycline-dépendante, CREB (Cyclic AMP Response Element Binding protein) et les protéines de remodelage de la chromatine telles que l'histone méthyltransférase G9a (Robison and Nestler, 2011).

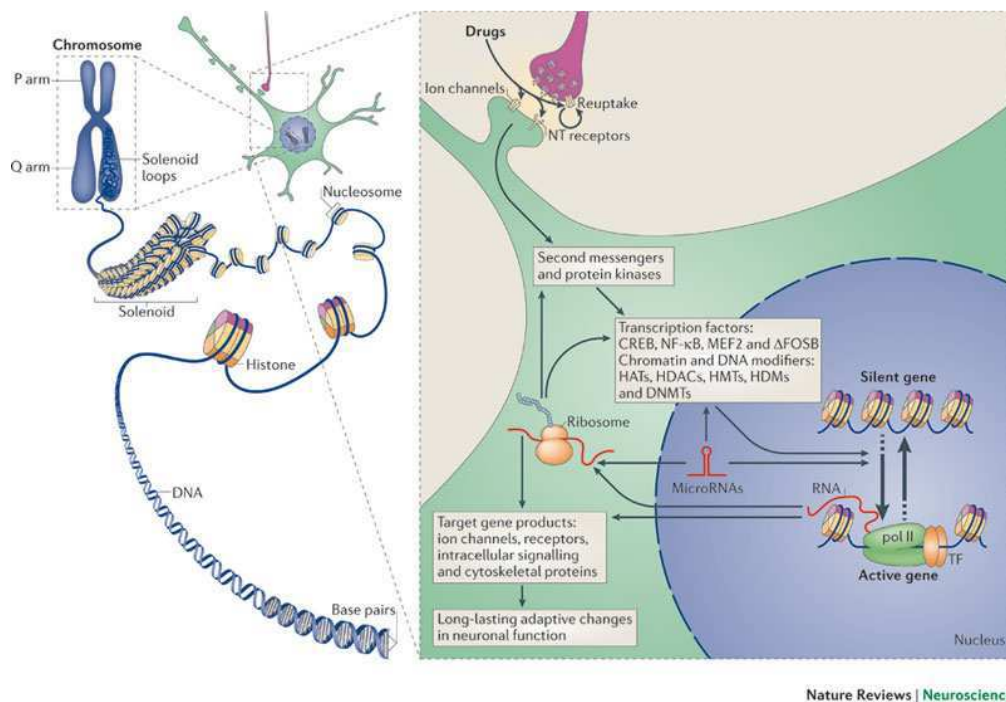


Figure 6 : Mécanismes de régulations transcriptionnel et épigénétique impliqués dans les neuroplasticités induites par les drogues, d'après Robinson et Nestler 2011.

Ces altérations morphologiques peuvent durer plusieurs semaines après l'exposition à la cocaïne. Ainsi, en modifiant la structure dendritique des neurones, la cocaïne modifierait la connectivité synaptique.

iiii. Altération de la plasticité synaptique

La plasticité synaptique peut à la fois se traduire par une augmentation ou une diminution de l'efficacité synaptique, appelée respectivement potentialisation à long terme (LTP) et dépression à long terme (LTD). La LTP et la LTD sont des propriétés de base de la plupart des synapses excitatrices dans le système nerveux central et sont utilisées dans de multiples fonctions cérébrales dont l'apprentissage et la mémoire (Malenka and Bear, 2004).

Il a été proposé que l'exposition aux drogues altère la plasticité synaptique dans certaines régions cérébrales. Une preuve directe de la plasticité synaptique induite au niveau de l'ATV par la cocaïne a été tout d'abord produite par Ungless et al., en 2001 en montrant qu'une seule injection de cocaïne suffit pour induire, en quelques heures, une potentialisation de la transmission synaptique excitatrice sur les neurones dopaminergiques de cette région i.e une

augmentation du rapport entre les courants ioniques AMPA/NMDA. Cette LTP est 1- transitoire puisqu'encore observée 5 jours après l'injection de cocaïne mais plus après 10 jours, 2- bloquée par l'administration d'un antagoniste NMDA et 3- retrouvée après administration d'autres drogues ayant des mécanismes d'action différents comme l'amphétamine, la morphine, la nicotine ou l'éthanol, alors que ni la fluoxétine (inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine utilisée dans le traitement de la dépression) ni la carbamazépine (prescrite dans le traitement de l'épilepsie) n'induisent de LTP à ce niveau (Ungless *et al*, 2001). Par contre, si la cocaïne est administrée pendant 12 jours la LTP dans l'ATV devient persistante et peut être détectée des mois après l'injection de cocaïne (Chen *et al*, 2008).

Au niveau du **NAC**, les neuroplasticités induites par la cocaïne sont plus complexes et apparaissent avec un délai plus long. Des injections répétées de cocaïne et une augmentation de l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV sont requises pour le transfert de la sensibilisation (développement d'une LTP) vers le NAC (Kourrich *et al*, 2007; Mameli *et al*, 2009). Plusieurs études ont tenté d'établir un lien entre l'altération de la plasticité dans le NAC et les conséquences comportementales d'une exposition répétée à la cocaïne. Ainsi il a été montré que l'altération de cette plasticité serait responsable de la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne (Pascoli *et al*, 2012) ou encore du comportement de rechute (Moussawi *et al*, 2009). La modification de la plasticité synaptique dans le NAC a même été proposée comme pouvant jouer un rôle dans la transition de la phase de consommation à la phase addiction (Kasanetz *et al*, 2010).

Enfin, l'exposition à la cocaïne induit également une augmentation prolongée de l'excitabilité des neurones du **CPFm** (Dong *et al*, 2005) et du noyau latéral de **l'amygdale** (Goussakov *et al*, 2006).

En conclusion, les études portant sur les neuroadaptations induites par la cocaïne ont permis de mieux comprendre les conséquences neurobiologiques d'une exposition chronique à cette drogue. Associées à d'autres données de la littérature, non mentionnées dans cette introduction, elles permettent d'avancer plusieurs propositions :

- Les études chez l'animal montrent que les dysfonctionnements cérébraux induits par l'exposition chronique à la cocaïne touchent des régions qui présentent des altérations

morphologiques et fonctionnelles chez l'homme indiquant qu'ils pourraient être une conséquence de la prise de drogues.

- Ces altérations (morphologiques, moléculaires et cellulaires) conduisent à une réorganisation des réseaux neuronaux engagés dans les processus d'apprentissage et de mémoire (Hyman, 2005; Hyman *et al*, 2006), de récompense et de contrôle de l'action (Goldstein and Volkow, 2011) qui peut être à la base des comportements addictifs.

- Ces dysfonctionnements affectent également des régions, qui comme nous le verrons par la suite, sont impliquées dans les processus émotionnels et notamment l'**anxiété** et dont les principaux relais sont le complexe amygdalien, l'hypothalamus et le cortex préfrontal (Bolla *et al*, 2004; Kalivas and O'Brien, 2008; Le Moal and Koob, 2007; Volkow *et al*, 2003).

1- 4 L'anxiété, un des facteurs de vulnérabilité à la consommation de cocaïne

Les facteurs de vulnérabilité à la consommation de drogues sont nombreux et résultent de l'interaction entre deux types de facteurs : les **facteurs individuels** de vulnérabilité (biologiques, psychologiques,...) et les **facteurs** de risque liés à l'**environnement** (facteurs socio-économiques, confrontations à des situations stressantes ou à des lieux préalablement associés à la consommation de la drogue,...). Comme nous allons le voir dans ce paragraphe, l'**anxiété** peut tout aussi bien être un facteur individuel de vulnérabilité à la consommation de cocaïne (individu à phénotype anxieux) qu'un facteur de risque lié à l'environnement (confrontations à des situations anxiogènes).

1- 4- 1 Facteurs individuels

Comme nous l'avons mentionné dans le paragraphe « Effet de la consommation chronique de cocaïne », l'addiction n'est pas uniquement le fait d'une exposition chronique à une drogue mais résulte de son interaction avec un phénotype vulnérable. Les études cliniques et épidémiologiques se sont focalisées sur des dimensions psychologiques telles que l'impulsivité et la réactivité au stress et sur les pathologies associées à l'addiction telles que l'anxiété ou la dépression qui prédisposeraient les individus à la consommation. Malgré certaines contradictions, des associations ont été trouvées entre ces traits de caractère ou pathologies et l'abus ou l'addiction (Brady and Verduin, 2005; Davis *et al*, 2008; Goodwin *et al*, 2002; De Los Cobos *et al*, 2011; Rounsaville, 2004; Rubin *et al*, 2007; Swendsen *et al*, 2010). Néanmoins, dans les études menées **chez l'homme**, il est difficile d'évaluer si un trait

comportemental est une conséquence ou une cause du développement de l'addiction. Les modèles animaux permettent de mieux clarifier l'importance de ces facteurs individuels.

Chez les rongeurs, comme chez l'homme, certains individus font preuve d'une plus grande vulnérabilité à la consommation soutenue de cocaïne et/ou à sa dépendance. Par exemple, le groupe de Piazza à Bordeaux en faisant la distinction entre deux groupes d'animaux d'une même souche, les rats qui expriment une forte réactivité motrice à un nouvel environnement (HRs ou High Responders) et ceux qui expriment une faible réactivité motrice (LRs ou Low Responders), a montré que les rats HRs acquièrent plus rapidement un comportement d'auto-administration de psychostimulants que les rats LRs (Piazza *et al*, 1990). Par contre, ces rats ne se distinguent pas par leur comportement compulsif d'auto-administration de cocaïne suggérant une dissociation entre vulnérabilité à l'usage de cocaïne et perte de contrôle de sa consommation.

Cette idée est confortée par des données plus récentes montrant que les rats HNR (High-novelty-preference), qui ont une préférence élevée pour la nouveauté, et les rats considérés comme impulsifs (HI ou High Impulsive), en se basant sur leur incapacité à attendre avant d'exécuter une réponse appropriée (Belin *et al*, 2008; Molander *et al*, 2011), sont plus prédisposés à la prise compulsive de cocaïne que les rats LNR (Low-novelty-preference) et les rats peu impulsifs (LI ou Low Impulsive) respectivement (Belin *et al*, 2011).

L'**anxiété** pourrait être également un trait favorisant la prise de cocaïne puisque les rats présentant un trait anxieux, défini sur la base de leur comportement dans l'EPM, ont plus d'attrait pour les effets de la cocaïne et sont plus vulnérables à la perte de contrôle de sa consommation (Dilleen *et al*, 2012; Pelloux *et al*, 2009).

Ces données démontrent que certains traits comportementaux peuvent favoriser différentes étapes du processus d'addiction : la réactivité à la nouveauté (HR/LR) peut être associée à une prédisposition à consommer la drogue alors qu'une préférence pour la nouveauté (HNR/LNR), l'impulsivité et l'anxiété seraient plutôt associées à la prise compulsive de la drogue.

1- 4- 2 Facteurs environnementaux

Les observations chez l'homme et les études effectuées sur les modèles animaux d'addiction ont permis de mettre l'accent sur trois facteurs environnementaux essentiels qui

contribueraient à la reprise de drogue ou au déclenchement de la rechute : l'**exposition à un stress**, l'**exposition aux indices environnementaux** rappelant la prise de drogues et l'**exposition à la drogue** elle-même (Cooper *et al*, 2007; Erb *et al*, 1996, 2000). Des études ont également montré une interaction entre ces différents facteurs, ceux-ci pouvant potentialiser leurs effets sur le comportement de reprise de cocaïne (Shelton *et al*, 2004).

Chez l'homme, des observations cliniques mettent en évidence un lien entre l'exposition chronique à des événements stressants et la vulnérabilité à l'addiction (Fox *et al*, 2008a). Chez les adolescents ayant fait face à des événements stressants dans leur vie ou ayant subi des maltraitances physiques ou morales (séparation des parents, abus sexuel, perte d'un parent,...), le risque de consommer des drogues est plus élevé (Dembo *et al*, 1988; Harrison *et al*, 1997). Des études ont également pu montrer la comorbidité des troubles anxieux et dépressifs, et le risque d'abus de drogues (Breslau *et al*, 2003; Kandel *et al*, 1997) (voir § 2-1-3 Prévalence et comorbidité des troubles anxieux).

Chez les sujets dépendants à la cocaïne et durant les périodes d'abstinence, l'exposition à un stress psychologique ou aux indices environnementaux associés à la prise de drogue déclenche une forte **anxiété** et une envie irrépressible de drogues ou « craving » (Chaplin *et al*, 2010; Contoreggi *et al*, 2003; Fox *et al*, 2008a; Sinha *et al*, 2000). Par exemple, Fox et al. ont montré que les personnes dépendantes à la cocaïne en période d'abstinence expriment une sensibilité plus élevée aux images à tonalité négative ou rappelant la consommation de drogues que dans le groupe d'individus témoins (Fox *et al*, 2008a). Ceci se manifeste par une hyperréactivité de l'axe corticotrope, une augmentation du rythme cardiaque et des niveaux de corticostérone plasmatiques, accompagnées d'une augmentation de l'envie de drogue (Sinha *et al*, 2000). Ces réponses psychologiques et physiologiques aux indices environnementaux stressants ou à ceux rappelant la prise de cocaïne s'accroissent avec la prise de la drogue (Fox *et al*, 2005) et sont considérées comme favorisant l'abus de drogues chez les usagers et la rechute chez les personnes dépendantes (Lejuez *et al*, 2008; Sinha *et al*, 2006). Très récemment Fox et al., ont montré que la guanfacine, un agoniste des récepteurs alpha 2 adrénergiques, en diminuant l'anxiété et les réponses du système autonome à la vue d'images à tonalité négative diminue également la sensation de « craving » chez les usagers de cocaïne (Fox *et al*, 2012).

Chez l'animal, les études ont également montré l'importance du stress dans la rechute. Chez les rats ayant appris à s'auto-administrer de la cocaïne, l'exposition à un choc électrique dans les pattes par exemple déclenche un comportement de recherche de la drogue même après une période d'extinction prolongée (Erb *et al*, 1996; Lu *et al*, 2003; Stewart, 2000). Il en est de même après l'administration de drogues anxiogènes (Kupferschmidt *et al*, 2009).

De plus, des études chez le rat montrent qu'un choc électrique ou encore l'administration d'une molécule anxiogène potentialise l'effet des indices environnementaux sur la reprise de cocaïne (Buffalari and See, 2009; Feltenstein and See, 2006), alors que l'administration d'anxiolytiques bloque la reprise de cocaïne induite par l'exposition aux indices environnementaux (Goeders *et al*, 2009).

En revanche, les rongeurs élevés dans un milieu enrichi conçu pour augmenter les opportunités de stimulations visuelles, somato-sensorielles et olfactives et la nouveauté (objets nouveaux placés dans la cage et régulièrement déplacés ou remplacés) développent une moindre sensibilisation comportementale et préférence de place conditionnée à la cocaïne (Solinas *et al*, 2008). Ce type de milieu enrichi bloque la reprise de cocaïne induite par un stress ou par l'exposition aux indices environnementaux associés à la drogue, même s'il ne permet pas de bloquer la reprise de cocaïne induite par l'exposition à la drogue elle-même (Chauvet *et al*, 2009; Thiel *et al*, 2009). Ces études suggèrent qu'un environnement enrichi pourrait avoir un effet préventif et même curatif sur le comportement d'addiction à la cocaïne.

En conclusion, l'anxiété, qu'elle soit induite par la consommation de cocaïne, des facteurs environnementaux ou qu'elle corresponde à un trait de personnalité, apparaît comme un facteur important dans la reprise de cocaïne ou dans le déclenchement de la rechute après une période d'abstinence. Il semble donc important de s'intéresser à cette composante psychologique et aux substrats neuronaux qui la sous-tendent afin de pouvoir mieux comprendre la neurobiologie de l'addiction. Avant d'aborder cette question il nous a semblé nécessaire de rappeler dans le 2^{ème} chapitre quelques notions sur l'anxiété, ses différentes formes pathologiques et les réseaux neuronaux impliqués dans son expression et/ou sa régulation.

2- L'anxiété

2- 1 Généralités

2- 1- 1 Définition

Le mot « anxiété » dérive du latin *anxietas* qui veut dire disposition à l'inquiétude. L'anxiété est une émotion qui peut être décrite comme étant une peur anticipée. Contrairement à la peur qui survient face à un danger réel, l'anxiété se déclenche face à un danger potentiel, incertain. Elle peut donc exister en l'absence d'événements menaçants et sa cause n'est pas forcément consciente. L'anxiété se traduit également par des réactions physiologiques (accroissement de la pression artérielle, tachycardie, sueurs...) et comportementales (augmentation de la vigilance et des réponses d'évitement) voisines de celles de la peur.

Une autre notion importante permet de distinguer l'anxiété d'état de l'anxiété de trait. L'anxiété d'état est suscitée ponctuellement en réponse à un contexte ou à une situation donnée. Elle est de nature immédiate et de courte durée. Par contre, l'anxiété de trait correspond à une caractéristique permanente, stable d'un sujet. Un sujet ayant une anxiété de trait aura une disposition importante à manifester de l'anxiété même en dehors de tout événement stressant. L'anxiété de trait est considérée comme un facteur prédisposant au développement des troubles anxieux.

2- 1- 2 Anxiété normale et pathologique

L'anxiété est une réaction émotionnelle normale qui permet à un individu de faire face à une menace éventuelle, c'est-à-dire de s'en protéger. Elle possède donc une valeur adaptative. Cependant, dans certains cas, l'anxiété peut devenir chronique et excessive par rapport aux situations auxquelles l'individu est confronté. On parle alors de pathologies anxieuses ou de troubles anxieux.

Le DSM-IV classe les pathologies anxieuses en plusieurs entités distinctes : l'anxiété généralisée, les troubles de panique, les états de stress post-traumatique (PTSD), les troubles obsessionnels et compulsifs (TOC) et les phobies (spécifiques ou sociales).

L'anxiété généralisée se caractérise surtout par une inquiétude et des soucis excessifs qui concernent différents aspects de la vie (famille, travail, santé, situation financière,...). Les personnes qui souffrent d'anxiété généralisée présentent souvent plusieurs des symptômes suivants : irritabilité, difficultés de concentration, tension musculaire, perturbations du sommeil et fatigabilité. Ce trouble anxieux est le plus commun parmi les différents troubles d'anxiété avec une prévalence de l'ordre de 3 à 4 % de la population générale.

Les troubles de panique se caractérisent par des attaques récurrentes de panique survenant de façon imprévisible. Ils se traduisent par des périodes brèves de peur ou de malaise intense, accompagnées de symptômes physiques (accélération du rythme cardiaque, transpiration, tremblements, impression d'étouffement, sensation d'étranglement, sensation de vertige) ou cognitifs (peur de perdre le contrôle de soi, peur de mourir).

Les PTSD se développent chez 15 % des sujets exposés à un événement traumatique durant lequel l'intégrité physique et/ou psychologique pour eux ou pour d'autres a été menacée (accident grave, catastrophe naturelle, viol, guerre, attentat...). Par la suite, cet événement traumatique est revécu sous forme de cauchemars ou « flashbacks » envahissants. Ces symptômes sont associés à des conduites d'évitement des situations en rapport avec la cause du traumatisme, des altérations du sommeil, de l'irritabilité, des difficultés de concentration et une hypervigilance.

Les TOC se manifestent par la présence d'obsessions (images, idées qui s'imposent à la conscience de manière répétitive et incoercible) accompagnées ou non de compulsions récurrentes (actes répétitifs accomplis par le sujet) qui sont à l'origine de sentiments de détresse, de perte de temps, et interfèrent avec les activités du sujet. Les obsessions les plus fréquentes concernent la contamination, l'accumulation, les préoccupations sexuelles, somatiques et religieuses. Les compulsions touchent le lavage, la vérification, la répétition, l'ordre, le comptage, l'accumulation et le contact. Ces comportements compulsifs réduisent l'anxiété induite par les obsessions, le soulagement ainsi apporté contribuant à renforcer la maladie.

La phobie spécifique est caractérisée par la crainte excessive ou peu raisonnable éprouvée à l'égard d'objets ou de situations simples (par exemple vol en avion, hauteur, animaux, vue de sang, ...). **La phobie sociale** est caractérisée par la crainte marquée, persistante, et

irraisonnée d'être observé ou évalué négativement en situation de performance ou d'interaction sociale. Elle est associée à des symptômes somatiques et cognitifs. Les situations craintes sont évitées ou bien sont supportées avec une anxiété et une détresse intenses. Ces situations comprennent la crainte de parler en public, de parler à des personnes peu familières ou d'être exposé à l'éventuelle observation d'autrui.

Bien que ces pathologies anxieuses se caractérisent par des manifestations comportementales très différentes, elles sont pour la plupart sensibles aux traitements chroniques avec des antidépresseurs. Avec l'efficacité des antidépresseurs, tels que les inhibiteurs sélectifs de la recapture de sérotonine, les anxiolytiques classiques tels que les benzodiazépines ne viennent que compléter le traitement.

2- 1- 3 Prévalence et comorbidité des troubles anxieux

Les troubles anxieux représentent en Europe les troubles psychiatriques les plus fréquents, touchant au cours d'une vie 20 à 30 % de la population générale (Kessler *et al*, 2005). Même si les troubles anxieux recouvrent des réalités très différentes, notamment en termes de sévérité, ils sont le plus souvent associés à des difficultés personnelles et socioprofessionnelles importantes et des altérations significatives de la qualité de vie.

Les données épidémiologiques ont permis de relever une forte comorbidité entre les différents troubles anxieux et d'autres troubles psychiatriques (dépression, schizophrénie) ou l'abus de drogues. Par exemple, l'anxiété et la dépression présentent des symptômes communs comme la sensibilité au stress, la fatigabilité, la perturbation du sommeil (Clark and Watson, 1991; Gorman, 1996; Pollack, 2005). En ce qui concerne la consommation abusive de drogues et les pathologies anxieuses, les études ont montré une forte prévalence de ces pathologies chez les personnes dépendantes à la cocaïne par exemple (Cox *et al*, 1990; Wasserman *et al*, 1997).

2- 2 L'anxiété chez les rongeurs

2- 2- 1 Modélisation des symptômes anxieux chez le rongeur

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'anxiété est un état mental complexe généralement défini chez l'homme par une forte composante psychologique difficile à quantifier. Chez l'animal, si la composante subjective des émotions n'est pas accessible il est

admis que leur expression comportementale et les processus neurobiologiques qui les sous-tendent le sont, d'autant que les structures et mécanismes sollicités dans les situations aversives ou de stress ont été largement conservés sur le plan évolutif chez les mammifères (McNaughton and Gray, 2000). Par ailleurs, de nombreux paramètres physiologiques (pression artérielle, rythme cardiaque, sécrétions endocrines) et comportementaux (évitement, fuite ou immobilité) utilisés pour rendre compte d'un état d'anxiété chez l'animal sont sensibles aux anxiolytiques efficaces chez l'homme. Ces données soutiennent l'idée que les composantes somatiques et comportementales de l'anxiété sont modélisables chez l'animal (Bourin *et al*, 2007).

2- 2- 2 Tests et modèles d'anxiété chez le rongeur

Les tests utilisés pour évaluer l'état anxieux chez les rongeurs (anxiété d'état) sont classés en deux catégories : les tests basés sur des aversions naturelles (ou tests non conditionnés) et les tests basés sur des aversions apprises (ou tests conditionnés).

Les tests non conditionnés sont basés sur la réaction innée et spontanée de l'animal face à une situation anxiogène alors que les tests conditionnés nécessitent une phase d'apprentissage ou de conditionnement durant laquelle un stimulus neutre (protocoles de peur conditionnée) ou récompensant (nourriture, boisson ou drogue ; protocoles de conflit) est associé à un stimulus aversif (choc électrique par exemple).

Les principaux tests conditionnés et inconditionnés utilisés chez les rongeurs pour évaluer un état anxieux sont récapitulés dans le tableau 2. Dans ce même tableau sont aussi présentés certains des modèles animaux créés par manipulations génétiques ou environnementales afin de produire un état d'anxiété pathologique (anxiété de trait ou modèles de troubles anxieux).

Tests d'évaluation de l'état anxieux aigu (anxiété d'état).	Modèles d'anxiété chronique exagérée (anxiété de trait).
<p>Tests non conditionnés</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Tests basés sur le conflit approche-évitement: <ul style="list-style-type: none"> – Open-field – Boîte claire/obscur – Labyrinthe en croix surélevé – Confinement dans un bras ouvert <input type="checkbox"/> Tests sociaux: <ul style="list-style-type: none"> – Interactions sociales – Compétitions sociales <input type="checkbox"/> Autres: <ul style="list-style-type: none"> – Marble burying – Hyponéophagie – Vocalisations induites par le stress – Hyperthermie induite par le stress <p>Tests conditionnés</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Tests basés sur le conflit: <ul style="list-style-type: none"> – Test de Geller-Seifter – Test de Vogel – Test d'aversion de place conditionnée <input type="checkbox"/> Autres: <ul style="list-style-type: none"> – Peur conditionnée – Enfouissement défensif 	<p>Anxiété innée</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Différences de souches <input type="checkbox"/> Différences interindividuelles <input type="checkbox"/> Modèles génétiques <p>Manipulations environnementales</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Elevage en conditions défavorables <ul style="list-style-type: none"> – Séparation maternelle – Sevrage précoce – Isolement social <input type="checkbox"/> Exposition chronique au stress <ul style="list-style-type: none"> – Stress chronique léger – Stress chronique social <p>Modèles nutritionnels</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Déficience en magnésium <p>Modèles pharmacologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Traitement chronique à la corticostérone <input type="checkbox"/> Sevrage à une drogue <p>Etat d'anxiété aigu</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Modèle pharmacologique

Tableau 2 : Représentation des différents tests et modèles d'anxiété développés chez les rongeurs d'après la revue de Sartori et al., (2011).

2- 3 Bases neurobiologiques de l'anxiété normale et pathologique

Les premières études portant sur les bases neurobiologiques de l'anxiété **chez l'homme** ont tiré profit de cas de patients ayant des lésions de l'amygdale, ou plus largement des lobes temporaux, suite à une ischémie, une résection chirurgicale de cette aire cérébrale (suite à une tumeur par exemple) ou une calcification de l'amygdale comme dans le cas de la maladie de Urbach-Wiethe (Tranel and Hyman, 1990). Ces patients manifestent une indifférence émotionnelle, c'est à dire une incapacité à attribuer une signification affective aux informations extérieures. L'importance de cette région dans les émotions a été confirmée par des stimulations chez des patients souffrant d'épilepsie sévère lors d'explorations préopératoires afin de délimiter la zone épileptogène. Chez ces patients, il a été montré que la stimulation de l'amygdale provoque des sentiments de peur et d'anxiété ainsi qu'une activation du système nerveux autonome.

L'essor des techniques de neuro-imagerie fonctionnelle (IRMf, EEG, PET...) a permis de décrypter les réseaux neuronaux impliqués dans l'expression et la régulation des émotions. La plupart des recherches ont basé leurs études concernant l'anxiété sur le traitement de stimuli visuels (photos d'expressions faciales ou corporelles, scènes ou film) ou auditifs (voix, musique) à tonalité émotionnelle négative. Différents protocoles expérimentaux ont été élaborés afin de distinguer les substrats neuronaux associés à l'expression de l'anxiété de ceux visant à la contrôler. Par exemple, des tâches demandant aux sujets d'amplifier, d'inhiber ou de réévaluer des émotions évoquées expérimentalement, tout en suivant leur activité cérébrale, ont permis de repérer les structures cérébrales engagées dans le contrôle des émotions et notamment de l'anxiété.

L'ensemble de ces études a permis d'établir une cartographie des circuits cérébraux impliqués dans l'anxiété chez le sujet sain (ne souffrant pas de pathologies anxieuses) et de déterminer à quels niveaux de ce réseau de structures se situent les dysfonctionnements associés à une pathologie anxieuse spécifique.

Ce réseau comporte aussi bien des régions corticales connues pour avoir un rôle cognitif comme le cortex cingulaire ou encore le cortex préfrontal médian, que des régions limbiques comme l'amygdale, l'hippocampe et l'insula. Ces différentes régions sont connectées entre elles et participent à l'élaboration d'une réponse émotionnelle face à une situation anxiogène.

Le schéma de la figure 7, proposé récemment par Etkin (Etkin, 2010) représente les différentes structures corticales et limbiques impliquées dans la **génération d'un état anxieux** qui est un processus complexe comportant :

- une phase d'**identification** des stimuli et de **production** de l'état émotionnel sous le contrôle des régions limbiques telles que l'amygdale, l'insula (Figure 7) ainsi que d'autres structures telles que l'hypothalamus et la substance grise périaqueducale, non représentées dans le schéma ci-dessous. Ces régions détectent les stimuli menaçants ou potentiellement menaçants et initient des réponses physiologiques et comportementales.
- une phase d'**évaluation** des stimuli avec attribution consciente ou inconsciente d'une valeur émotionnelle (positive ou négative) sous le contrôle de la partie dorsale du cortex préfrontal (cortex cingulaire dorsal ou dACC et cortex médiodorsal dmPFC dans la figure 7).
- et une phase de **régulation** de l'état affectif, du comportement émotionnel et des réponses générées par les régions limbiques sous le contrôle de la partie ventrale du cortex préfrontal médian ainsi que des parties rostrale et subgénuaire du cortex cingulaire (vmPFC, rACC, sgACC respectivement dans la figure 7).

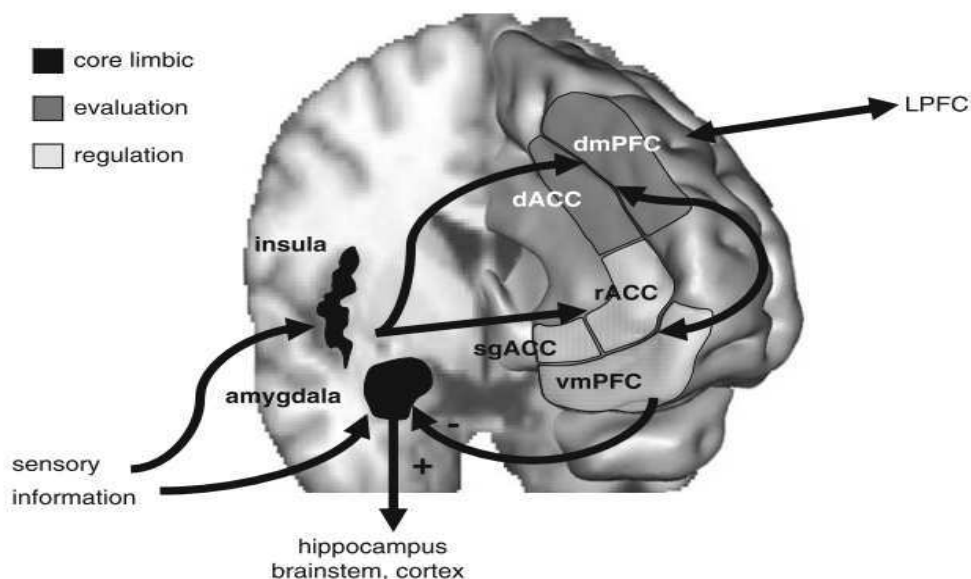


Figure 7 : Structures cérébrales impliquées dans les différentes étapes du processus anxieux.

D'autres équipes, notamment celle de Gross et de Phillips ont proposé des modèles très analogues. Le modèle de Gross, à la différence de celui d'Etkin, attribue au cortex préfrontal un rôle dans la **régulation** des émotions sans faire de distinction entre les parties dorsales et ventrales, alors que les régions limbiques effectuent une **évaluation** du stimulus anxieux (Gross and Hen, 2004).

Dans le modèle de Phillips (Phillips *et al*, 2008) le système d'**identification** et d'**évaluation** de la signification émotionnelle des stimuli implique le **système ventral** comprenant les régions limbiques et la partie ventrale du cortex préfrontal médian alors que le système de **régulation** implique le **système dorsal** incluant la partie dorsale du cortex préfrontal médian et l'hippocampe.

Quels que soient les modèles proposés, le réseau cérébral impliqué dans l'état anxieux est constitué d'une partie limbique qui identifie les stimuli menaçants et qui est responsable de la génération de l'état anxieux, et d'une partie corticale intervenant dans leur évaluation et leur régulation pour une réponse émotionnelle plus adaptée.

En ce qui concerne les différentes **pathologies anxieuses**, Etkin rapporte dans une revue les résultats d'une méta-analyse sur les dysfonctionnements neuronaux associés aux traitements des émotions négatives (Etkin and Wager, 2007). Cette revue inclue une combinaison d'études dans lesquelles des images, sons ou textes spécifiques ou non spécifiques à un trouble anxieux sont utilisés pour induire des états anxieux. Dans les PTSD, l'anxiété généralisée et les phobies spécifiques, on observe de manière très reproductible une hyper-activation de l'amygdale et du cortex insulaire par rapport aux individus témoins. Par contre, les patients souffrant de PTSD sont les seuls chez qui une hypo-activation du cortex cingulaire antérieur rostral et des cortex préfrontal dorso- et ventro-médian est également observée ; cette hypo-activation corticale pouvant refléter un déficit dans la régulation des émotions.

Cependant l'observation d'une hypo- ou hyper-activation dans certaines régions, notamment les régions corticales, peut dépendre du type de tâches expérimentales utilisées et non seulement du trouble anxieux dont souffre le patient. Dans les paradigmes expérimentaux où l'on demande aux sujets de réduire leurs émotions à la vue d'images à tonalité négative, ceux présentant un trait anxieux élevé activent plus fortement leur cortex préfrontal médian et latéral que les sujets sains, révélant ainsi la nécessité d'un plus grand engagement de ces régions corticales pour réguler leurs émotions (Campbell-Sills *et al*, 2011).

Dans une revue récente Shin et Liberzon (2010) ont récapitulé l'ensemble des dysfonctionnements cérébraux observés en fonction de la nature des pathologies anxieuses étudiées (Tableau 3).

	Amygdala	rACC	dACC	Hippocampus	Insular cortex
Posttraumatic stress disorder	↑	↓	↑*	↑↓	↑↓
Panic disorder	↑↓*	↑*	—	↑↓	—
Social phobia	↑	↑↓*	↑↓	—	↑
Specific phobia	↑	↑↓*	↑	—	↑
Generalized anxiety disorder	↑↓*	↑*	↑*	—	—

rACC = rostral anterior cingulate cortex; dACC = dorsal anterior cingulate cortex.
 ↑ = increased function in the disorder (relative to control groups).
 ↓ = decreased function in the disorder (relative to control groups).
 ↑↓ = mixed findings.
 * = based on a very small number of studies.
 — = too little information available.

Tableau 3 : Modifications fonctionnelles cérébrales observées dans les différentes pathologies anxieuses d'après la revue de Shin et Liberzon (2010).

Chez les rongeurs, l'étude des substrats neuronaux impliqués dans l'anxiété a été abordée par de multiples approches : lésion électrolytique de certaines structures cérébrales, administration d'agents pharmacologiques par voie systémique ou locale ou encore par visualisation de marqueurs cellulaires d'activation neuronale.

Les études neuroanatomiques utilisant des marqueurs d'activation neuronale comme les protéines Fos ou Zif-268 ont montré l'activation de certaines structures cérébrales lors de situations anxiogènes. Bien qu'il y ait des différences de réactivité selon les situations, il existe des structures communes activées quelle que soit la situation anxiogène à laquelle l'animal doit faire face, telles que le cortex préfrontal, le complexe amygdalien, le septum, l'hypothalamus ou encore la substance grise périaqueducule (Duncan *et al*, 1996; Graeff *et al*, 1993; Hinks *et al*, 1996).

Ces études ont permis d'identifier les structures sollicitées dans une situation anxiogène, cependant une relation causale entre ces différentes activations et le comportement anxieux restait à établir. Pour cela, des études visant à inhiber ou activer localement une structure par l'injection d'agents pharmacologiques ou par des lésions focales et en étudier l'impact sur le comportement anxieux de l'animal sont plus appropriées pour répondre à cette question. C'est

ainsi qu'il a été montré que l'inactivation de la partie ventrale du cortex préfrontal médian chez le rat (vCPFm) a un effet anxiolytique sur le comportement (Shah *et al*, 2004; Stern *et al*, 2010) et diminue les réponses du système nerveux autonome (Tavares *et al*, 2009) et endocrinien (Radley *et al*, 2006) de l'animal. De même l'inactivation de l'amygdale (Müller and Fendt, 2006), du noyau de la strie terminale (BNST) (Fendt *et al*, 2003), du septum latéral et de l'hippocampe ventral (Trent and Menard, 2010) ont des effets anxiolytiques.

Plus récemment, la manipulation sélective de circuits neuronaux par approche optogénétique permettant de contrôler l'activité des neurones par la lumière a permis de mettre en évidence l'importance des projections spécifiques entre l'amygdale basolatérale et l'amygdale centrale dans le processus de contrôle de l'anxiété chez les souris (Tye *et al*, 2011).

En ce qui concerne **l'anxiété pathologique**, différents modèles ont été développés chez les rongeurs (Tableau 3). Cependant, il est bien entendu difficile de modéliser séparément les différentes pathologies anxieuses qui existent chez l'homme. On peut penser que, suivant les tests d'anxiété utilisés chez les rongeurs, des facettes différentes de l'état anxieux soient révélées.

Des lignées de rats ont ainsi été génétiquement sélectionnées sur la base d'un trait hyper anxieux (high-anxiety-related behavior ; HAB) dans le test du labyrinthe en croix surélevé (ou EPM) (Liebsch *et al*, 1998). Ces rats présentent un comportement anxieux non seulement dans l'EPM mais aussi dans les test de l'Open-field et de confinement dans un bras ouvert (ou OA) par rapport aux rats sélectionnés sur la base d'un trait hypo anxieux (low-anxiety-related behavior ; LAB) (Salome *et al*, 2004). Des lignées de souris présentant spontanément un trait anxieux (les souris BALB/c) par rapport à leur homologue ne présentant pas ce trait de caractère (les souris C57BL/6) ont également été utilisées comme modèle d'anxiété pathologique.

Cependant les études en neuroanatomie ou neuroimagerie ayant abordé la question des dysfonctionnements cérébraux liés à ces états d'anxiété pathologique sont relativement limitées. La comparaison de la réactivité neuronale dans ces différentes lignées révèle des altérations fonctionnelles au niveau de certaines régions telles que le cortex préfrontal médian, l'amygdale ou les aires thalamiques et hypothalamiques, chez les animaux ayant un trait hyper anxieux suite à une exposition à des situations anxiogènes, par rapport à ceux ayant un trait hypo anxieux (Kalisch *et al*, 2004; Muigg *et al*, 2009; O'Mahony *et al*, 2010; Salome *et al*, 2004). Ces observations convergent avec les altérations observées en neuroimagerie au

niveau du cortex préfrontal et de l'amygdale par exemple chez les personnes souffrantes de troubles anxieux.

Pour conclure, même si les analogies entre l'homme et le rongeur sont souvent difficiles à établir toutes ces études ont permis d'identifier des réseaux neuronaux impliqués dans le traitement des stimuli anxieux. Ce réseau est essentiellement constitué du **cortex préfrontal médian** ainsi que certaines régions limbiques comme l'**amygdale**, l'**hypothalamus** ou encore l'**hippocampe**. Le fonctionnement de ces différentes structures peut être différemment altéré selon la pathologie anxieuse qui se manifeste.

OBJECTIF GENERAL DE LA THESE

OBJECTIF GENERAL DE LA THESE

Ces dernières décennies ont fourni une masse considérable de données sur les neuroadaptations cérébrales induites par l'exposition à la cocaïne d'une part (voir § 1- 3- 3 Cocaïne et neuroadaptations cérébrales) et la neurobiologie de l'anxiété d'autre part (voir § 2- 3 Bases neurobiologiques de l'anxiété normale et pathologique). Cependant très peu d'études ont cherché à identifier les substrats neuronaux sous-tendant l'anxiété pathologique induite par une exposition chronique à la cocaïne. Les études destinées à caractériser ces substrats neuronaux se sont surtout focalisées sur l'implication de différents types de récepteurs comme les récepteurs β -adrénergiques (Harris and Aston-Jones, 1993), les récepteurs cannabinoïdes (Kupferschmidt *et al*, 2012), les récepteurs aux opiacés de type delta (Perrine *et al*, 2008) ou encore au CRF (Corticotropin-Releasing Factor) (Basso *et al*, 1999; Sarnyai *et al*, 1995).

Dans une tentative de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant cette perturbation de l'état émotionnel, le but de cette thèse était d'identifier les **altérations neuronales** sous-jacentes à l'**état d'anxiété pathologique** se manifestant lors d'un **sevrage à la cocaïne chez le rat**. Ce travail de thèse est subdivisé en trois grandes parties:

Une partie comportementale qui a consisté à évaluer le comportement anxieux au cours du sevrage après un traitement chronique à la cocaïne chez le rat. Plusieurs tests d'évaluation de l'état anxieux ont été utilisés pendant une période de sevrage allant de 2 à 28 jours.

Le comportement pseudo-dépressif des rats au cours du sevrage a également été évalué puisque les troubles anxieux sont souvent accompagnés de troubles dépressifs et que ces derniers sont souvent observés chez les personnes consommant de la cocaïne.

Une partie neuroanatomique qui a consisté à étudier la réactivité des régions cérébrales chez les rats sevrés de cocaïne exposés à une situation anxiogène telle que le confinement dans un bras ouvert surélevé, et ceci en utilisant une approche immunohistochimique basée sur l'expression de marqueurs d'activation neuronale comme les protéines Fos ou Zif-268.

Finalement, au vu de nos résultats montrant une forte altération de la réactivité du dCPFm chez les rats sevrés, nous avons cherché à établir un lien entre la réactivité de cette région et les manifestations d'un état anxieux exagéré. Pour cela nous avons eu recours à une approche pharmacologique qui consiste à injecter localement des agents inhibiteurs ou activateurs de l'activité neuronale, et à en étudier les répercussions sur les comportements anxieux.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1- Animaux

Les expériences ont été menées sur des rats mâles Sprague-Dawley (Charles River, France) pesant entre 200 et 225 g à leur arrivée.

Les animaux sont hébergés par groupes de 4 dans des cages en Plexiglas dans une animalerie climatisée ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) et sont soumis à un cycle lumière-obscurité de 12h /12h (lumière de 7h à 19h). Les rats ont accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum* et sont acclimatés à ces conditions d'hébergement. Ils sont laissés au moins une semaine dans cet environnement avant toute manipulation expérimentale et sont pesés une fois par jour afin de réduire les effets stressants de leur manipulation.

Les expérimentations sont effectuées en accord avec les directives 86/609 du Conseil des Communauté Européenne sur les soins et utilisation des animaux.

2- Traitements pharmacologiques

2- 1 Agents pharmacologiques

La cocaïne (chlorhydrate de cocaïne, Cooper, France) est dissoute dans une solution saline (NaCl 0,9 %, Revol, France). Une dose de 20 mg/kg est administrée par injection intrapéritonéale (i.p.) dans un volume de 1 ml/kg.

Le muscimol (Sigma-Aldrich, France), agoniste sélectif des récepteurs GABA-A, est dissous dans du NaCl aux concentrations de 20 et 100 ng/0,5 μl . Il est administré par voie intracérébrale.

2- 2 Traitement chronique à la cocaïne

Les rats reçoivent 14 injections i.p. de la solution de cocaïne (20 mg/kg, 1 ml/kg) ou de son solvant (NaCl 1 ml/kg), à raison d'une administration par jour excepté les weekends. Ce protocole a été choisi puisqu'il a été montré qu'il est capable d'induire un état d'anxiété élevé chez les rats à 2 jours de sevrage (Paine *et al*, 2002; Rudoy and Van Bockstaele, 2007).

2- 3 Administration intracérébrale de muscimol

2- 3-1 Implantation des canules intracérébrales

Les rats sont anesthésiés avec un mélange Kétamine (Vibrac, France)/Xylasine (Bayer) administré par voie i.p. (Kétamine=100 mg/kg ; xylasine=10 mg/kg). Ils sont ensuite placés dans un appareil stéréotaxique (David Kopf Instruments, USA) avec la barre d'incisives placée à 3,3 mm en-dessous de la ligne interaurale de façon à ce que la tête de l'animal soit horizontale. La température corporelle est contrôlée à l'aide d'une sonde rectale et maintenue à 37,5°C par une couverture chauffante thermostatée (Harvard Apparatus, UK) placée sous l'animal. La peau du crâne est incisée sagittalement et réclinée de part et d'autre de la ligne médiane. L'os est nettoyé afin que les sutures crâniennes soient visibles. Le crâne est percé à l'aide d'une fraise dentaire et les méninges découpées à l'aide du bout recourbé d'une aiguille pour permettre l'implantation bilatérale des canules guides. Les canules guides sont des tubes en inox (23 gauge, Interchim, France) ajustés à une longueur de 12 mm. Elles sont implantées de manière à ce que leur extrémité se situe dans la partie dorsale du cortex préfrontal médian, avec un angle de 6° par rapport à la verticale. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées ont été définies d'après l'atlas de Paxinos & Watson (2004) :

Antéro-postériorité (AP) = + 3,2 mm par rapport au Bregma

Latéralité (L) = ± 1 mm par rapport au Bregma

Profondeur (V) = - 2,6 mm par rapport à la surface du crâne

Les canules guides sont fixées au crâne par du ciment dentaire (Austen Dental Products Ltd, Royaume-Uni) et trois vis d'ancrage (Anthagyr, France). Les canules sont protégées par un cône en plastique fixé sur le crâne également à l'aide de ciment dentaire et ce dernier est ensuite appliqué sur toute la surface exposée du crâne pour consolider l'ensemble. Un mandrin (tube en inox, 30 gauge, Interchim, France) est inséré dans chaque canule pour éviter leur obturation. Le mandrin est ajusté à une longueur de 12,5 mm de façon à ce qu'il dépasse de 0,5 mm de la canule guide. En fin de chirurgie, la peau est recousue à l'aide d'un fil de suture (SS-652 5-0, Sofsilk, Covidien, France). Une solution de Vétédine (Centravet, France) est appliquée localement sur la plaie pour éviter la survenue d'infection, et 5 ml de glucose à 5 % (Lavoisier, France) sont injectés par voie i.p. Un anti-inflammatoire non stéroïdien, la Rimadyl, (5mg/kg, 1ml/kg, Pfizer) est injecté par voie sous-cutanée.

Les rats sont ensuite replacés à l'animalerie dans des cages individuelles. Ils y sont laissés jusqu'à récupération (5 à 7 jours), c'est-à-dire jusqu'à ce qu'ils aient retrouvé un poids au moins égal à celui qu'ils avaient avant l'opération. Les animaux sont manipulés et pesés tous les jours par l'expérimentateur et les mandrins sont enlevés et remis en place tous les deux jours afin d'éviter que les canules ne se bouchent.



Figure 8 : Photographie représentant un rat dans sa cage d'hébergement après l'implantation intracérébrale de canules.

2- 3-2 Procédure de microinjection

Les microinjections sont réalisées chez des animaux non anesthésiés. Le rat est maintenu en douceur et les deux mandrins remplacés par deux injecteurs constitués de tubes en acier inoxydable (30 gauge, Interchim, France) de longueur telle qu'ils dépassent des canules guides de 1,0 mm. Chaque injecteur est raccordé à un cathéter en Tygon (de diamètre 0,51 mm + PE 10) contenant la solution pharmacologique et connecté à une seringue en verre Hamilton de 50 μ l (Interchim, France). Un volume de 0,5 μ l de muscimol ou de NaCl est injecté à l'aide d'une pompe (Harvard Apparatus, PHD 2000, USA) pendant 1 min (débit 0,5 μ l/min). Les injecteurs sont laissés en place pendant 1 min supplémentaire pour faciliter la diffusion de la solution. Ils sont alors retirés et remplacés par les mandrins.

2- 3-3 Contrôle histologique du site d'injection

A la fin des expériences, le rat est euthanasié avec une quantité suffisante de pentobarbital. Son cerveau est prélevé et congelé à -20°C. Des coupes frontales de 30 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat (CMT – 950 A –, Microm, France). Elles sont ensuite colorées au rouge neutre et visualisées au microscope afin de vérifier le site d'implantation identifiable grâce à la trace laissée par la canule.

3- Evaluation comportementale

Le jour du test comportemental, la cage d'hébergement des rats est placée dans la pièce d'expérimentation une heure avant le test, afin que les rats s'habituent à ce nouvel environnement. Des groupes indépendants sont utilisés pour chaque test comportemental et pour les différentes périodes de sevrage.

3- 1 Tests pour évaluer l'état anxieux des rats

3- 1- 1 Le labyrinthe en croix surélevé (EPM)

Ce dispositif (Panlab, France), en forme de croix (Figure 9) est surélevé à 65 cm au dessus du sol. Il comporte quatre bras ($L = 50 \text{ cm} \times l = 10 \text{ cm}$) opposés deux à deux ; deux de ces bras sont fermés par des parois grises de 49 cm de haut tandis que deux autres sont ouverts et entourés de baguettes de Plexiglas de 0,5 cm de haut. Les bras sont reliés par une plate-forme centrale ($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$). Le sol de l'ensemble est noir. La pièce est faiblement éclairée par deux lampes halogènes d'intensité réglable placées de part et d'autre du labyrinthe afin d'obtenir une luminosité d'environ 10 lux au niveau de la plateforme centrale. Ce dispositif est surmonté d'une caméra vidéo permettant d'enregistrer le comportement de l'animal pendant la durée du test.

Les rats sont placés au centre du dispositif, face à un bras ouvert, et laissés libres de l'explorer pendant 5 min. Le plancher est nettoyé à l'éthanol 10% entre chaque rat afin d'éviter toute odeur pouvant modifier le comportement de l'animal suivant. Plusieurs variables classiques ont été mesurées par analyse des enregistrements vidéo : le nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts (BO) et fermés (BF). Une entrée est comptabilisée lorsque les quatre pattes de l'animal franchissent le seuil du bras. Ces données permettent de calculer le temps passé dans la plateforme centrale considéré comme un indicateur d'hésitation entre approche et évitement des bras les plus anxiogènes, le nombre total d'entrées dans l'ensemble des bras,

considéré comme un bon indicateur de l'activité locomotrice de l'animal, ainsi que le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts (BO) ($\text{temps passé dans les BO} \times 100 / \text{temps BO} + \text{temps BF}$) considéré comme reflétant l'état anxieux de l'animal (Cruz *et al*, 1994).

D'autres paramètres plus éthologiques ont été relevés, pour compléter l'analyse comportementale. Ceci inclut la mesure du nombre de redressements (un animal se tenant sur ses deux pattes postérieures est en position de redressement) et du temps passé à faire des mouvements de « head-scans » définis comme des mouvements d'étirement de la tête pour explorer l'environnement, souvent accompagnés par des reniflements en l'air.

La validation du labyrinthe en croix surélevé en tant que dispositif pour la mesure de l'anxiété chez les rongeurs est basée sur des critères comportementaux, physiologiques (e.g. le taux de corticostérone) et pharmacologiques (Pellow *et al*, 1985). Compte-tenu de l'aversion des rongeurs pour les espaces ouverts et la hauteur, les bras ouverts du dispositif sont plus anxiogènes que les bras fermés. Ainsi, un animal qui explore plus les bras ouverts sera considéré comme étant « peu anxieux », alors qu'un animal qui reste confiné dans les bras fermés du dispositif, sera lui, considéré, comme étant « anxieux ».

3- 1- 2 Le confinement dans un bras ouvert (OA)

Ce test est une variante du labyrinthe en croix surélevé (Figure 9). Il a été utilisé par plusieurs équipes pour étudier l'anxiété chez les rongeurs (Mairesse *et al*, 2007; Pellow *et al*, 1985; Salomé *et al*, 2006).

Dans ce test, les rats sont placés au milieu d'un bras ouvert sans accès à la plate-forme centrale. Le bras est virtuellement divisé en deux parties : une partie distale considérée plus anxiogène et une partie proximale, cette dernière est la plus proche de la plate-forme centrale et est considérée plus sécurisante pour l'animal. Le comportement de l'animal est enregistré pendant 5 min et différents paramètres sont mesurés tels que : le nombre d'entrées et le temps passé dans chaque partie du bras, le nombre de redressements de l'animal et le temps passé à faire des « head-scans », des « head-dips » définis comme des mouvements d'inclination de la tête dans le vide en guise d'exploration ou encore le nombre de redressements. Le temps passé en posture de « freezing » est également mesuré. Les périodes de « freezing » se caractérisent par une immobilité totale de l'animal à l'exception des mouvements respiratoires. Pour plus de précision ce dernier paramètre est mesuré de manière directe par l'observateur au moment du test.

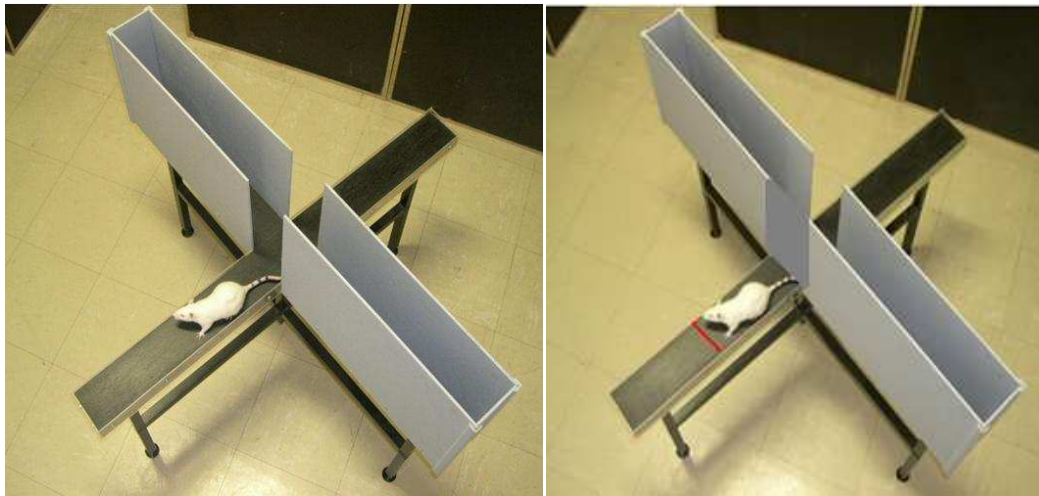


Figure 9 : Le labyrinthe en croix surélevé (EPM) à gauche et le confinement dans l'un des bras ouvert de ce labyrinthe (OA) à droite.

3- 1- 3 Le test d'enfouissement défensif

Il est réalisé dans une cage de Plexiglas transparente (41 cm de long, 25 cm de profondeur et 21 cm de haut) contenant 5 cm de litière (sciure de bois, Harlan). Une sonde électrifiée amovible (7 cm de long, 1,2 cm de profondeur et 0,8 cm de haut ; Intellibio, France) est placée 2 cm au-dessus de la litière et fixée sur l'une des parois de la cage (Figure 10). Cette sonde est connectée à un générateur électrique (Bilaney Consultant, Allemagne) actionné manuellement et calibré pour délivrer un courant de 5 mA lorsque l'animal la touche, généralement avec les pattes avant ou le museau. Les rats sont placés (3 à 4 par cage) dans cette cage sans la présence de la sonde les deux jours précédents le jour du test et à raison d'une heure par jour afin qu'ils s'habituent à cet environnement. Le test débute par le placement d'un animal dans la partie distale de la cage par rapport à la sonde. Après le premier choc électrique avec la sonde, le comportement de l'animal est observé et enregistré pendant 15 min. Cinq minutes après le premier choc électrique, la sonde est désactivée. Différentes variables sont observées et mesurées au cours de l'analyse des enregistrements: la latence à revenir vers la sonde électrifiée après le premier choc, le temps passé à enfouir la sonde et le temps d'immobilisation de l'animal (corps immobile excepté de lents mouvements latéraux de la tête). L'immobilité est considérée comme un état passif révélant une anxiété chez l'animal puisque ce dernier évite de faire face au stimulus anxiogène alors que

l'enfouissement de la sonde par la litière est considéré comme un état actif où l'animal essaye de faire face à la situation anxiogène.

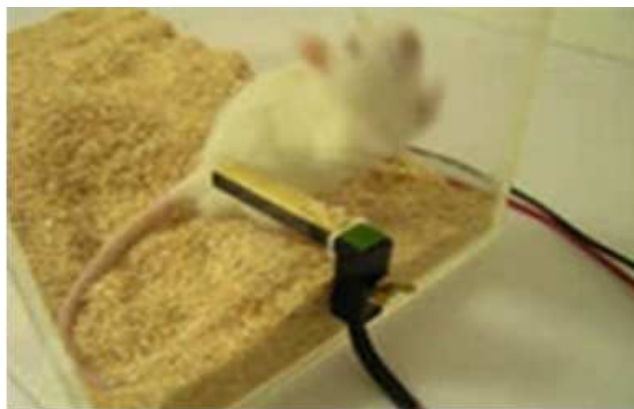


Figure 10 : Cage comportant une sonde électrifiée pour le test de d'enfouissement défensif.

3- 2 Tests pour évaluer l'état pseudo-dépressif des rats

3- 2- 1 Le test de la nage forcée

Le modèle de Porsolt, ou test de la nage forcée, est un test pharmacologique prédictif de l'efficacité antidépressive d'une molécule. Ce test est largement utilisé pour mettre en évidence les propriétés antidépressives potentielles de nouvelles molécules. Il consiste à contraindre les rats à nager dans une enceinte close, sans possibilité de s'échapper. Au bout de quelques minutes, la proportion de temps passé à nager diminue au profit du comportement d'immobilité, c'est-à-dire que l'animal flotte passivement en n'effectuant que les mouvements nécessaires au maintien de sa tête hors de l'eau. Le temps d'immobilité est un indicateur de l'état pseudo-dépressif ou résigné de l'animal. Il est réduit par l'administration de la plupart des antidépresseurs classiques.

La procédure utilisée est celle décrite par Porsolt (Porsolt *et al*, 1978). Un pré-test est réalisé pendant lequel chaque rat est introduit pendant 15 min dans un cylindre en Plexiglas (50 cm de hauteur et 20 cm de diamètre) contenant 35 cm d'eau maintenue à la température de $25 \pm 0,5$ °C. Cette profondeur ne permet pas à l'animal de poser ses pattes arrière sur le fond du cylindre. Vingt-quatre heures après le pré-test, un test de 5 min est réalisé dans les mêmes conditions. Pour chaque test ou pré-test, les rats sont préalablement habitués à la pièce d'expérimentation faiblement éclairée (12 lux) pendant une heure. Le test de 5 min est

enregistré par une caméra située sur le côté du cylindre et les mouvements de l'animal sont analysés par le logiciel Videotrack (Viewpoint, Lyon, France), permettant de mesurer trois paramètres : la durée de l'immobilité, la durée de la nage et la durée de l'escalade (ces deux derniers paramètres étant considéré comme des tentatives d'échappement).

Après chaque session de nage, l'animal est séché rapidement avec une serviette et placé sous une source de chaleur pendant environ 30 min, puis replacé dans sa cage d'hébergement. L'eau du cylindre est changée entre chaque animal.



Figure 11 : Le test de la nage forcée.

3- 2- 2 Le test de la consommation d'eau sucrée

Ce test est basé sur un paradigme de libre choix entre deux biberons, l'un contenant de l'eau, l'autre une solution de saccharose.

Pendant une phase d'habituation de 24 h, chaque rat est placé dans une cage individuelle avec accès libre à la nourriture et en présence de deux biberons d'eau placés sur les bords de la cage et séparés par les croquettes alimentaires (Harlan, France).

Pendant la phase de test, le contenu d'un des deux biberons est remplacé par une solution de saccharose. Dans un premier temps, différentes concentrations de saccharose sont testées (0,025, 0,05, 0,1, 0,5 ou 0,8 %) pendant 48 heures afin de définir la concentration pour laquelle les rats développent une préférence robuste mais non-maximale pour le saccharose. Cette concentration est ensuite utilisée pour tester l'état hédonique des animaux au cours du traitement chronique à la cocaïne pour un premier groupe et pendant la période de sevrage

pour un deuxième groupe. Les biberons sont pesés et inversés toutes les 24 heures pour éviter les effets d'habituation.

La préférence pour le saccharose est un bon indicateur de l'état hédonique de l'animal. Ainsi une diminution de cette préférence indiquerait un état anhédonique qui constitue l'un des symptômes observés lors d'un épisode dépressif chez l'homme.

Cette préférence est évaluée en pourcentage de la consommation totale de liquide. Ainsi, une consommation de 50 % de la solution de saccharose signifie qu'il n'y a pas de préférence par rapport à l'eau, alors qu'une préférence atteignant 100% indique une consommation exclusive de la solution sucrée.



Figure 12 : Cage avec libre accès à deux biberons l'un contenant de l'eau, l'autre une solution de saccharose pour le test de la consommation d'eau sucrée.

4- Neuroanatomie

Notre approche de neuroanatomie est basée sur l'immunohistochimie de deux marqueurs d'activation cellulaire, la protéine Fos et la protéine Zif-268 ainsi qu'un marqueur nucléaire des neurones (NeuN pour neuronal nuclei) et un marqueur des astrocytes, la protéine gliale acide fibrillaire ou GFAP pour Glial Fibrillary Acidic Protein. En fonction des objectifs, l'immunohistochimie de Fos est couplée celle des protéines NeuN ou GFAP ou à l'hybridation in situ de l'ARNm du transporteur vésiculaire du glutamate (vGlut 1 pour vesicular glutamate transporter 1) ou de l'ARNm de la glutamate décarboxylase ou GAD pour glutamic acid decarboxylase.

4- 1 Perfusion des animaux

Pour toutes les expériences de neuroanatomie fonctionnelle, les rats sont profondément anesthésiés au pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) et rapidement perfusés par voie intracardiaque avec 200 ml d'une solution de NaCl 0,9 %, puis avec 400 ml d'une solution contenant 4 % de paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, France) dissous dans du tampon phosphate (PB) 0,1 M, pH 7,4.

Le cerveau est ensuite prélevé et post-fixé une nuit à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde à 4 %, puis placé dans du PB 0,1 M, pH 7,4 contenant 30 % de saccharose (Fluka, France) pendant 36 à 48 heures à 4°C, afin de permettre une cryoprotection du tissu.

Le cerveau est congelé dans une solution d'isopentane à - 40°C pendant 5 min, puis conservé à - 20°C entouré de Parafilm. Il est coupé en sections frontales de 30 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat. Les coupes sont prélevées dans une solution cryoprotectrice contenant du tampon PB 10 mM, pH 7,4, du glycérol (20 %) et de l'éthylène glycol (30 %). Elles sont ensuite conservées à - 20°C.

4- 2 Immunohistochimie

4- 2- 1 Principe général

La localisation de neurones contenant un marqueur donné par immunohistochimie sur coupes de tissu fait appel à des réactions antigène-anticorps. Le protocole que nous avons utilisé est basé sur l'utilisation d'anticorps primaires spécifiques révélés par la méthode avidine (A)-biotine (B). Le complexe avidine-biotine conjugué à la peroxydase constitue un système d'amplification du signal permettant de détecter des quantités d'antigènes trop faibles pour être décelées par les systèmes enzymatiques directs.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé comme chromogène la 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) qui induit une coloration brun clair en présence de peroxydase et de H₂O₂. La DAB peut être associée au chlorure de nickel (NiCl₂) pour induire une coloration bleue-noire.

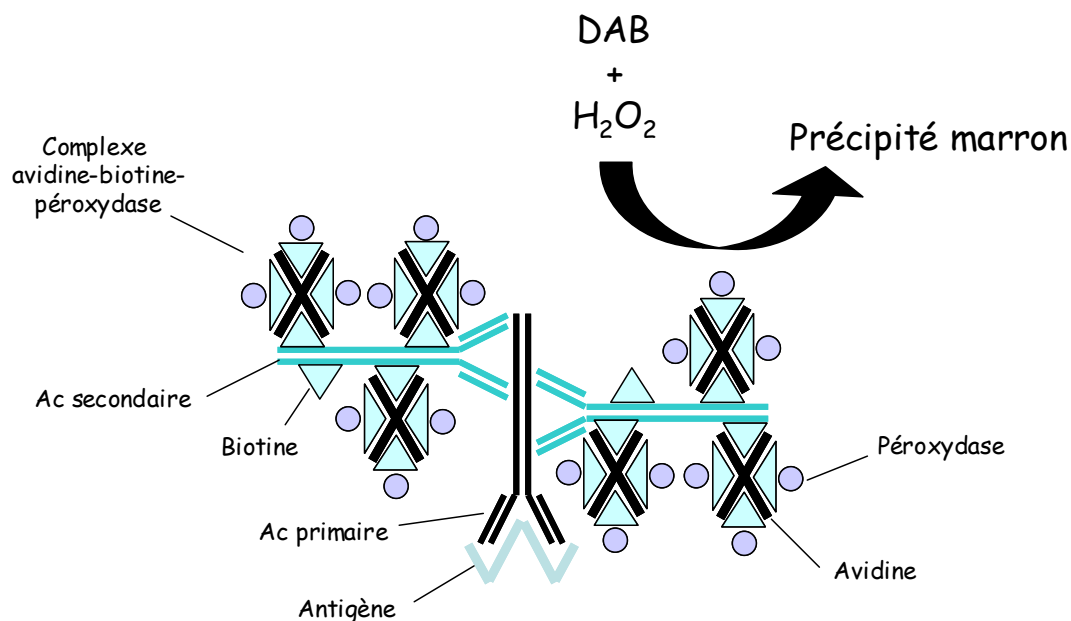


Figure 13 : Représentation générale du principe de révélation avec le complexe avidine-biotine. L'anticorps primaire se fixe sur l'antigène contenu dans le tissu. Un second anticorps marqué avec de la biotine est dirigé contre l'anticorps primaire pour amplifier la réaction. Le complexe enzymatique avidine-biotine-peroxydase se fixe à l'anticorps secondaire. En dégradant du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'enzyme libère un proton, provoquant un changement de coloration de la DAB et l'obtention d'un précipité marron.

4- 2- 2 Immunohistochimie des protéines Fos et Zif-268

Les coupes de cerveau sont rincées 3 fois 10 min dans du tampon PB contenant 0.9% de NaCl et 0.3% de Triton X-100 (PBST) à température ambiante et sous agitation. Cette opération est répétée après chacune des étapes suivantes :

- Incubation pendant une nuit avec un anticorps primaire de lapin dirigé contre la protéine Fos (SC-52, Santa Cruz Biotechnologies, Etats-Unis), dilué au 1/4000, ou contre Zif-268 (SC-110 Santa Cruz Biotechnologies, Etats-Unis) dilué au 1/2000 dans du PBST contenant 1% d'albumine sérique de bœuf (Sigma-Aldrich, France). L'anticorps dirigé contre la protéine Fos est un anticorps polyclonal de lapin, purifié par affinité, qui reconnaît une séquence peptidique située dans la fraction N-terminale de cette protéine. La spécificité de cet anticorps a été testée par la technique de Western blot. La bande de protéine reconnue, suite à l'administration aiguë de cocaïne, est de poids moléculaire attendu, environ 55 KD.
- Incubation, pendant 90 min, avec l'anticorps secondaire biotinylé de chèvre anti-lapin (Vector Laboratories, USA), dilué au 1/1000 dans du PBST.

- Incubation, pendant 60 min, avec le complexe avidine (A) - biotine (B) conjugué à la peroxydase (Elite ABC kit, Vector Laboratories, Etats-Unis), contenant les réactifs A et B dilués au 1/100 dans du PBST.

- Révélation de l'activité de la peroxydase dans du tampon Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 contenant 0.05 % de DAB (Sigma-Aldrich, France), 0.1 % de NiCl₂ (Sigma-Aldrich, France), et 0.01 % de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂ ; Sigma-Aldrich, France) pendant 10 min.

Les coupes sont ensuite contre-colorées avec une solution de rouge neutre 1% afin de pouvoir délimiter les différentes zones cérébrales sélectionnées pour le comptage des neurones exprimant les différents marqueurs.

4- 2- 3 Double marquage des protéines NeuN/GFAP

Un protocole expérimental identique au précédent est utilisé. Les coupes de cerveaux sont incubées avec l'anticorps primaire de lapin dirigé contre la GFAP (Dako ; dilué à 1/8000) et révélé par le mélange DAB/NiCl₂ puis avec l'anticorps primaire de souris dirigé contre NeuN (Chemicon ; dilué à 1/8000) et révélé par la DAB.

4- 2- 4 Doubles marquage Fos/ARNm vGlut 1 et Fos/ARNm GAD

La protéine Fos est visualisée par immunohistochimie en utilisant le protocole décrit précédemment mais en ajoutant dans toutes les solutions 2 µl d'inhibiteur de RNase par ml de tampon (RNase I, Sigma R7397).

- Après révélation de l'activité peroxydase en présence de la DAB pendant 15 min, les coupes de cerveau sont rincées 2 fois 10 min dans du PBST puis 1 fois 10 min dans une solution de citrate de sodium salin (SSC) avant d'être incubées pendant une nuit dans le tampon d'hybridation contenant la sonde ARN GAD (Julien *et al*, 1987) ou vGlut 1 (Herzog *et al*, 2001) marquée à la digoxigénine. Les sondes sont hybridées à 65°C (33 µg/ml de la sonde GAD et 10 µg/ml de la sonde vGlut 1).

- Les coupes de cerveau sont ensuite rincées à 60-65°C 2 fois 20 min dans un mélange de SSC, 50 % formamide et Tween-20 à 0,1 % et incubées 15 min avec de la RNase A (82 U/mg) diluée dans un tampon Tris 10 mM, pH 8, contenant 1mM d'EDTA et 500 mM de NaCl.

- Les coupes de cerveau sont rincées 3 fois 10 min dans du PBST.

- Incubation une nuit avec l'anticorps de mouton anti-digoxigénine marqué à la phosphatase alcaline (Roche-Boehringer) dilué au 1/2000 dans du tampon PBST contenant 1 % d'agent bloquant (Roche-Boehringer).
- Les coupes de cerveau sont rincées successivement 2 fois 10 min dans du PBST, 1 fois 10 min dans du PBS et 1 fois 10 min dans le tampon de révélation de la phosphatase alcaline.
- Révélation avec du NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Roche-Boehringer) dans le tampon de révélation contenant du Tris HCl 0.1 M, pH 9,5, du NaCl 0.1 M, du MgCl₂ 50 M et du Tween à 0.01 %. La révélation se fait à 37°C à l'abri de la lumière. Elle dure 2 à 5 heures.

4- 2- 5 Montage et coloration des coupes

Les coupes sont montées sur lames gélatinées et séchées à température ambiante.

Les coupes traitées pour l'immunohistochimie sont ensuite hydratées dans de l'eau distillée puis colorées pendant 2 min dans une solution de rouge neutre à 1 %, pH 4,8 (Merck, France). Les coupes sont ensuite déshydratées dans une succession de bains d'éthanol de concentration croissante (75° - 95° - 95° - 100° - 100°) pendant quelques secondes, puis plongées dans 2 bains successifs d'OTIX pendant 2 min. Les lames sont montées sous lamelles avec du DePex (Gurr, UK) comme milieu de montage.

Après l'hybridation *in situ*, les coupes sont simplement passées dans un bain d'Ottix (MM France) puis montées sous lamelles dans du Vectamount (Vector Laboratories).

4- 2- 6 Analyse des coupes et quantification

L'analyse qualitative des coupes est effectuée à l'aide d'un microscope photonique (Axioskop 20, Zeiss, Allemagne).

Les analyses quantitatives des données anatomiques sont réalisées à l'aide d'un système informatique d'analyse d'images équipé du logiciel Mercator 2 (ExploraNova, La Rochelle, France), couplé au microscope dont la platine est équipée de capteurs de coordonnées en X et en Y et d'une caméra numérique connectée à un moniteur. Les sections analysées sont standardisées en accord avec l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos, 1998).

Ce système permet de dessiner à faible grossissement (x 4) le contour des coupes et les structures anatomiques, et de pointer les différents types de neurones marqués à plus fort grossissement (x 10). Les pointages se font manuellement et sans connaissance préalable du

groupe auquel appartient l'animal. Pour chaque rat et chaque région au moins deux coupes sont analysées et dans les deux hémisphères. Pour chaque rat, la densité moyenne de cellules immunoréactives (le nombre total de cellules comptées divisé par la surface de mesure en mm^2) est déterminée et utilisée pour l'analyse statistique.

5- Analyses statistiques

Lorsque la distribution des variables s'écarte de la normalité, les résultats sont analysés en utilisant des tests non paramétriques à l'aide des logiciels AnaStats. Les variables sont analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis et les analyses post-hoc avec le test U de Mann et Whitney pour comparer les différents groupes expérimentaux deux à deux.

Pour le test de consommation d'eau sucrée, les résultats sont analysés par une ANOVA à deux facteurs, un facteur intra-sujet, le temps, et un facteur inter-sujet, le traitement en utilisant le logiciel Statview.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées comme significatives.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

TRAVAIL EXPERIMENTAL

Chapitre I : Evolution des comportements anxio-dépressifs chez les rats au cours d'un sevrage à la cocaïne

1- Introduction

Comme nous l'avons précédemment décrit dans les « Rappels bibliographiques », l'exposition chronique à la cocaïne peut induire des symptômes anxio-dépressifs marqués pendant les périodes de sevrage chez l'homme.

Des symptômes analogues ont été observés chez les rongeurs avec un fort niveau d'anxiété observé généralement pendant les premiers jours suivants l'arrêt des injections ou de prise de cocaïne (Basso *et al*, 1999; Kupferschmidt *et al*, 2009; Paine *et al*, 2002; Yang *et al*, 1992). Quant aux symptômes de type dépressifs, les données sont assez contradictoires avec l'observation d'un comportement de résignation chez les rats sevrés de cocaïne dans certains cas (Filip *et al*, 2006; Hall *et al*, 2010; Perrine *et al*, 2008), et pas de différence dans d'autres (Frankowska *et al*, 2010).

Dans cette étude, nous avons voulu évaluer l'évolution des comportements anxio-dépressifs dans un **même modèle animal de sevrage à la cocaïne** en utilisant **plusieurs tests comportementaux** au cours d'une période allant de **2 jusqu'à 28 jours de sevrage**.

2- Résultats

2- 1 Déroulement des expériences

Les animaux ont reçu des injections répétées de cocaïne dans leur cage d'hébergement pendant 14 jours excepté les weekends, et leurs états anxieux et pseudo-dépressif ont été étudiés pendant une période de sevrage allant de 2 à 28 jours. Ce protocole d'administration de cocaïne induit une sensibilisation comportementale à ce psychostimulant, toujours présente 33 jours après la fin du traitement (résultat obtenu dans notre équipe lors d'une étude préalable). Ceci atteste de la mise en place de neuradaptations cérébrales durables induites par ce traitement. Il est important de noter que ce traitement chronique à la cocaïne n'induit pas de modifications dans la prise de poids chez les animaux (données non présentées).

L'effet anxiogène du sevrage a été mesuré à 2, 8 ou 28 jours après la dernière injection de cocaïne et à l'aide de trois tests comportementaux : l'EPM, l'OA et le test d'enfouissement défensif. Les tests d'EPM et d'OA sont basés sur un conflit exploration/évitement de situations aversives mais il a été montré que l'OA est plus anxiogène pour l'animal (Pellow *et al*, 1985). Nous avons également évalué cet état anxieux dans un troisième test basé sur le comportement défensif de l'animal.

L'effet du sevrage sur le comportement de résignation a été évalué par le test de la nage forcée à 2 et 15 jours de sevrage. L'état hédonique des rats a également été évalué pendant le traitement à la cocaïne et au cours des différentes périodes de sevrage (de 2 jours jusqu'à 28 jours de sevrage).

Différents groupes de rats sont utilisés pour les différents tests comportementaux et les différentes périodes de sevrage.

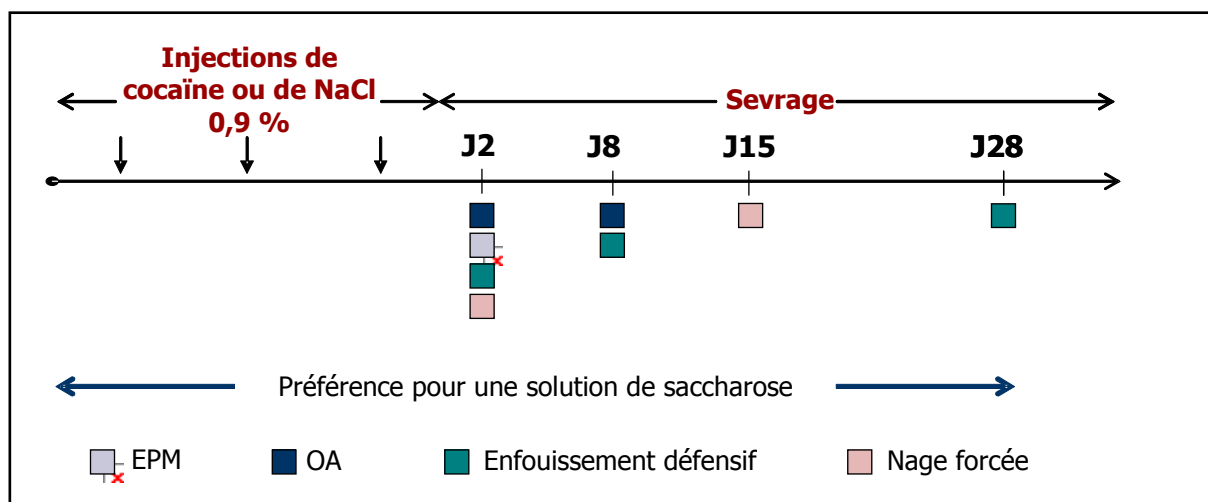


Figure 14 : Protocole expérimental.

2- 2 Evaluation du comportement anxieux

2- 2- 1 Evaluation de l'anxiété par les comportements exploratoires

Les résultats obtenus en plaçant les animaux dans l'**EPM** montrent qu'à 2 jours de sevrage, les rats traités à la cocaïne explorent cet environnement non familier autant que les rats traités au NaCl comme en témoignent le nombre total d'entrées dans les bras du dispositif

(Figure 15.A), le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts (Figure 15.B) et le temps passé dans la plateforme centrale (NaCl : $49,28 \pm 10,5$ sec; Cocaïne : $45,6 \pm 10,13$ sec).

La prise en compte de variables plus éthologiques révèle une diminution de la durée des « head-scanning » chez les rats sevrés (Figure 15.C). Il est à noter que les rats adoptent très peu de postures de redressements ou d'immobilité dans l'EPM.

Trois des différents paramètres mesurés sont représentés sous forme d'histogrammes dans la figure ci-dessous.

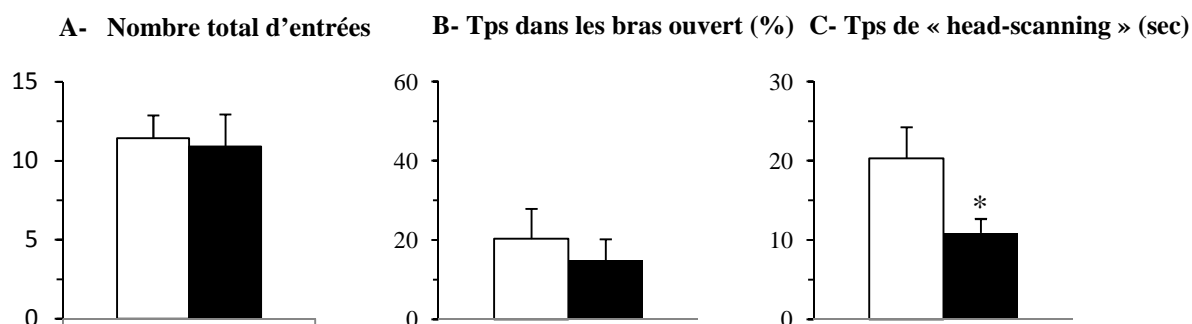


Figure 15 : Comportements exploratoires observés dans le labyrinthe en croix surélevé à 2 jours de sevrage chez les rats témoins (en blanc) et sevrés (en noir) (n = 7-10). Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM. *p < 0.05 versus le groupe traité au NaCl.

L'analyse du comportement des animaux confinés dans l'OA au cours du sevrage montre que les rats traités à la cocaïne manifestent des postures de « freezing » non observées chez les rats traités au NaCl que ce soit à 2 ou 8 jours de sevrage (Figure 16.A). Ce comportement est associé à une diminution des mouvements de « head-scanning » (Figure 16.B) et des redressements (Figure 16.C).

Le calcul du pourcentage de temps passé dans la partie distale du bras ouvert (Figure 16.D) ou du temps passé dans la partie centrale (NaCl : $26,4 \pm 8,19$ sec ; Cocaïne : $18,21 \pm 3,58$ sec à J2 de sevrage ; NaCl : $27,62 \pm 5,45$ sec ; Cocaïne : $20,29 \pm 8,01$ sec à J8 de sevrage) ne révèle aucune différence entre les deux groupes de rats.

Quatre des différents paramètres mesurés sont représentés sous forme d'histogrammes dans la figure 16.

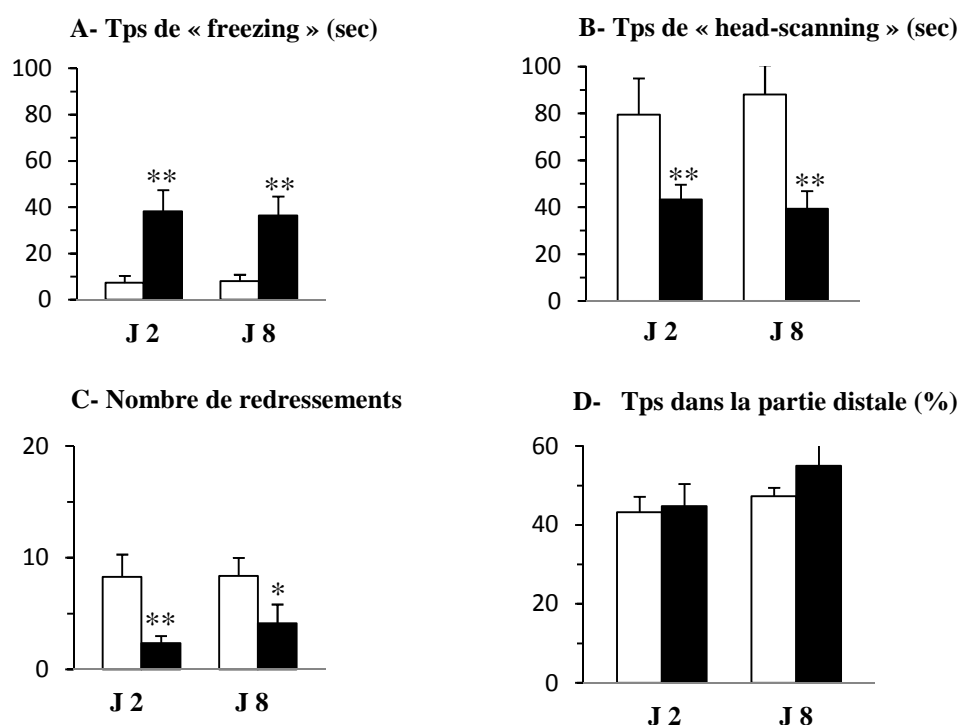


Figure 16 : Comportements exploratoires observés dans le bras ouvert à 2 et 8 jours de sevrage chez les rats témoins (en blanc) et sevrés (en noir) ($n = 10-14$ à J2 et $n = 7-13$ à J8 pour les groupes NaCl et cocaïne respectivement). Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus le groupe traité au NaCl.

2- 2- 2 Evaluation de l'anxiété par les comportements défensifs

Comme nous l'avons expliqué dans la partie « Matériels et méthodes » le test d'enfouissement défensif consiste à délivrer un choc électrique à l'animal quand ce dernier est en contact avec une sonde placée dans la cage. Les réponses comportementales qui s'en suivent sont de différents ordres : redressements et reniflements intensifs de la grille qui ferme la cage pouvant être interprétés comme la recherche d'une issue pour fuir, l'immobilisation en état d'alerte alternant avec l'exploration de la litière par le flair et la projection de sciure sur la sonde à l'aide des pattes et du museau. Pour quantifier l'anxiété déclenchée par les chocs électriques nous avons utilisé trois paramètres : 1) le temps passé par l'animal à rester immobile, 2) celui passé à enfouir la sonde et 3) la latence de retour vers la sonde après le 1^{er} choc.

Dans nos conditions expérimentales, c'est l'immobilisation de l'animal en état d'alerte qui permet le mieux de mettre en évidence l'anxiété au cours du sevrage. Deux, 8 et 28 jours après la fin du traitement à la cocaïne, le temps d'immobilité est significativement plus

important chez les rats sevrés que chez les rats témoins (Figure 17.A), même si ce dernier diminue au cours du temps.

Parallèlement, on observe une absence presque totale de comportement d'enfouissement de la sonde chez les animaux traités à la cocaïne par rapport aux animaux témoins au 2^{ème} jour de sevrage (Figure 17.B). Cette différence entre les deux groupes de rats s'estompe au 8^{ème} et 28^{ème} jour de sevrage.

Enfin, les animaux traités à la cocaïne mettent plus de temps que les animaux témoins à revenir vers la sonde électrisifiée après un premier choc, bien que le seuil de significativité ne soit atteint qu'à partir du 8^{ème} jour de sevrage (Figure 17.C).

Les différents paramètres mesurés sont représentés sous forme d'histogrammes dans la figure ci-dessous.

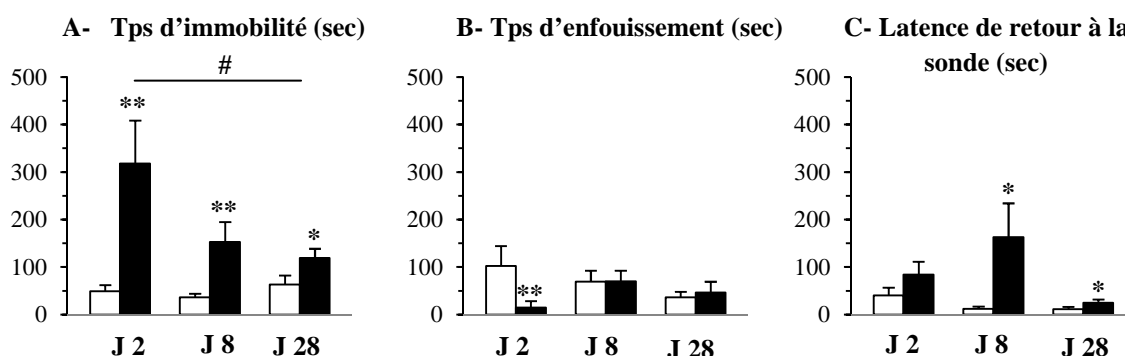


Figure 17 : Comportements observés dans le test d'enfouissement défensif à 2, 7 et 28 jours de sevrage chez les rats témoins (en blanc) et sevrés (en noir) (n = 10-14). Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM. *p < 0.05, **p < 0.01 versus le groupe traité au NaCl et #p < 0.05 versus les rats traités à la cocaïne à 2 jours de sevrage.

2- 3 Evaluation du comportement pseudo-dépressif

2- 3- 1 Comportement de résignation dans le test de la nage forcée

La figure 18 illustre les effets du sevrage à la cocaïne sur le comportement des rats dans le test de la nage forcée. Les résultats ne montrent aucune différence de comportement entre les rats traités à la cocaïne et les rats témoins. En effet, les différents paramètres mesurés (durées d'immobilité, de nage et d'escalade) ne diffèrent pas entre les deux groupes de rats que ce soit à 2 ou 15 jours de sevrage.

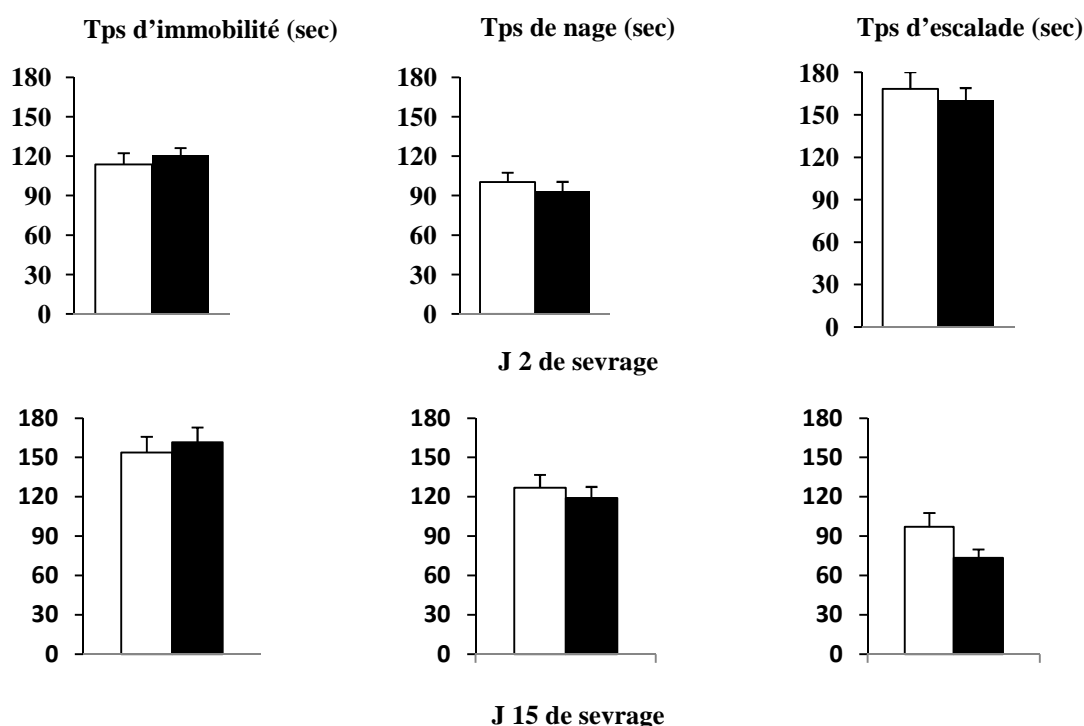


Figure 18 : Comportements observés dans le test de la nage forcée à 2 et 15 jours de sevrage chez les rats témoins (en blanc) et sevrés (en noir) ($n = 8-10$). Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM.

2- 3- 2 Préférence pour une solution sucrée

Dans un premier temps nous avons recherché la concentration minimum de saccharose induisant une consommation préférentielle par rapport à celle de l'eau. Nos résultats indiquent que les rats détectent une différence entre l'eau et l'eau sucrée lorsque celle-ci contient au moins 0,5 % de saccharose ($p < 0.01$) (Figure 19.A). A cette concentration une préférence d'environ 70 % pour cette boisson est observée. Elle est donc choisie pour les études suivantes car elle devrait permettre de révéler aussi bien des augmentations que des diminutions de consommation de saccharose.

Au cours du traitement à la cocaïne, la consommation d'eau sucrée chez les rats témoins ou traités à la cocaïne est identique ($F_{1,10} = 0,89$; ns) (Figure 19.B). La préférence pour l'eau sucrée est d'environ 80% et se maintient à ce niveau au cours du traitement. De même, aucune différence n'est observable pendant la période de sevrage ($F_{1,8} = 1,10$; ns) (Figure 19.C) entre ces deux groupes de rats. La consommation totale de liquide, environ 40 ml par jour, reste constante au cours du temps dans ces deux conditions expérimentales.

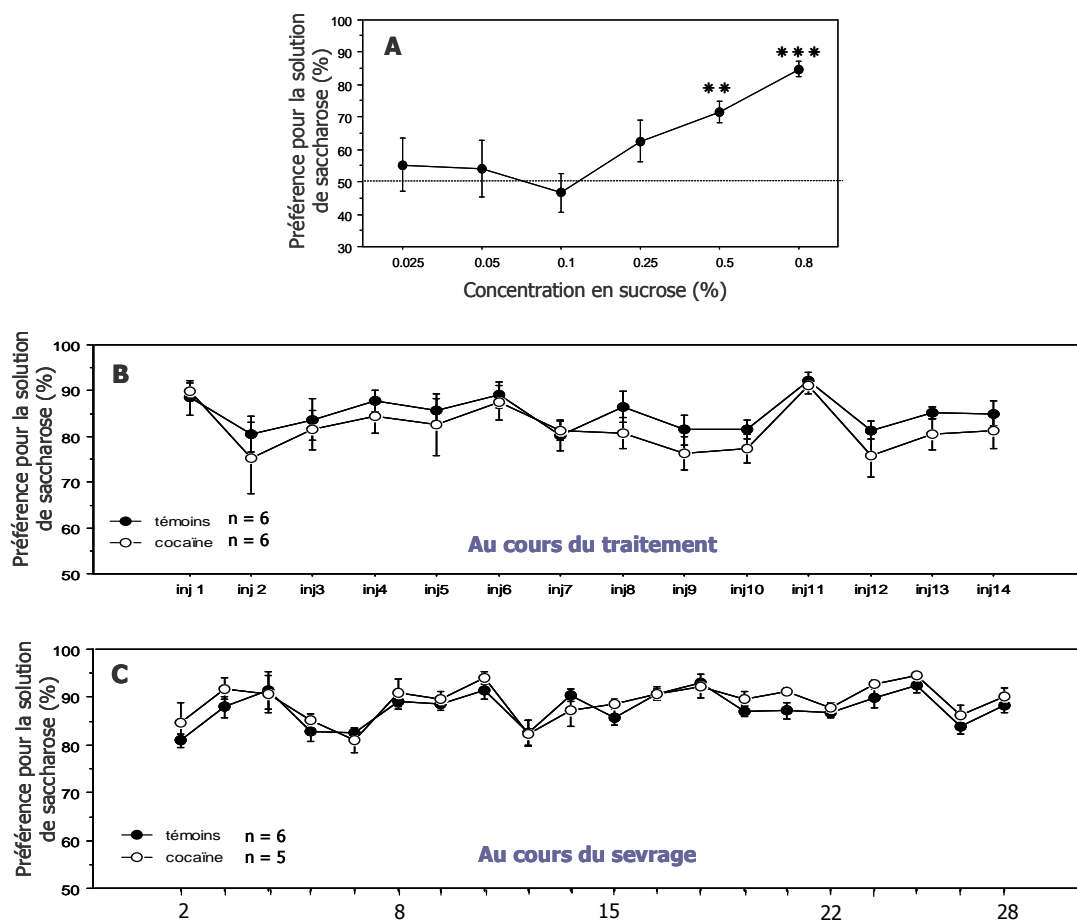


Figure 19 : Evaluation de la consommation d'une solution de saccharose. **A :** Mesure de la préférence pour une solution sucrée en fonction de sa concentration en saccharose ; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. **B et C :** Evaluation de la préférence pour une solution de saccharose 0.5 % au cours du traitement à la cocaïne (B) et du sevrage (C).

3- Discussion

3- 1 Effet d'un sevrage à la cocaïne sur l'état anxieux des animaux

L'effet d'un sevrage à la cocaïne sur l'état anxieux des animaux a tout d'abord été abordé à l'aide d'un test comportemental classiquement utilisé chez les rongeurs et validé par un ensemble de données pharmacologiques, le test de l'**EPM** (Pellow *et al*, 1985). Les résultats que nous avons obtenus montrent que dans nos conditions expérimentales, les rats traités à la cocaïne explorent autant que les rats témoins les parties anxiogènes du dispositif, c'est-à-dire les bras ouverts ; de plus, les variables éthologiques comme les postures d'immobilité, de

redressement ou de « head scans » sont peu ou pas modifiées par un traitement à la cocaïne. Ces résultats suggèrent que les rats sevrés de cocaïne ne sont pas plus anxieux que les rats témoins dans ce dispositif et dans nos conditions expérimentales. Le nombre total d'entrées dans les différents bras du labyrinthe ne diffèrent pas entre les deux groupes de rats ; ce paramètre étant utilisé comme index d'activité locomotrice (Dawson *et al*, 1995), ceci suggère qu'elle n'est pas affectée par le traitement à la cocaïne.

Certaines équipes rapportent qu'après un traitement chronique à la cocaïne similaire à celui que nous avons adopté, les rats sevrés depuis 2 jours manifestent une augmentation de leur niveau d'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé (Paine *et al*, 2002; Rudoy and Van Bockstaele, 2007; Sarnyai *et al*, 1995). D'autres équipes, adoptant le même protocole, montrent que cet état émotionnel n'est pas affecté (Basso *et al*, 1999). Ceci est sans doute lié aux différentes conditions expérimentales utilisées (intensité de l'éclairage du dispositif, discontinuité du traitement les weekends,...), à la complexité de cet état émotionnel et au grand nombre de facteurs environnementaux pouvant affecter son expression.

Suite à cette première expérience, nous avons fait l'hypothèse que l'exposition à un environnement plus anxiogène permettrait de mieux révéler des différences de réactivité émotionnelle entre les animaux traités à la cocaïne et leurs témoins. En d'autres termes, si le sevrage à la cocaïne induit un état anxieux celui-ci serait plus facilement mis en évidence lorsque l'animal doit faire face à une situation plus aversive.

Dans ce but, les rats ont été confinés dans un des bras ouverts du labyrinthe surélevé (test de l'OA) sans possibilité de refuge dans une zone moins anxiogène comme la plateforme centrale ou les bras fermés. Ce test est considéré plus anxiogène que le confinement dans un bras fermé ou l'exposition à la totalité du labyrinthe en croix surélevé puisqu'il induit une plus forte augmentation des taux de corticostérone plasmatique (Pellow *et al*, 1985).

Dans nos expériences, l'exposition à cet environnement déclenche chez les rats en sevrage de cocaïne une réponse passive beaucoup plus prononcée que chez les rats témoins. Cette réponse se traduit par des postures de « freezing » de durée plus longue au cours de la première semaine de sevrage. Ce comportement semble se développer au détriment des mouvements exploratoires comme les « head scans » ou les redressements moins nombreux que chez les témoins. Par ailleurs, le nombre d'entrées dans la partie distale du bras ouvert est identique dans les deux groupes de rats, ce qui suggère que l'augmentation du temps de

« freezing » chez les rats sevrés ne correspond pas à une diminution de leur capacité motrice mais peut être interprétée comme une augmentation de leur niveau d'anxiété.

Cette analyse est soutenue par des résultats obtenus dans le laboratoire montrant que l'administration de diazépam, un anxiolytique classique de la famille des benzodiazépines, diminue les temps de « freezing » chez les animaux sevrés sans affecter leur activité locomotrice spontanée. Les benzodiazépines restent parmi les anxiolytiques les plus efficaces et les plus prescrits et ils sont utilisés dans les études précliniques pour attester que les comportements d'inhibition comportementale observés chez l'animal sont bien des formes d'expression anxieuse.

Des résultats similaires ont été observés avec des modèles d'anxiété chez les rongeurs : les rats HAB manifestent un comportement plus anxieux dans l'OA que les rats LAB (Kalisch *et al*, 2004; Salomé *et al*, 2006). Egalement les rats ayant subi un stress prénatal adoptent une stratégie passive d'immobilité dans l'OA par rapport aux rats témoins qui adoptent plutôt une stratégie active d'hyperlocomotion (Mairesse *et al*, 2007).

Nous avons ensuite complété cette étude en utilisant un troisième paradigme expérimental, le **test d'enfouissement défensif**, pouvant faire intervenir un autre type de comportement anxieux chez l'animal (Basso *et al*, 1999; De Boer and Koolhaas, 2003; Pellow *et al*, 1985). Deux types de réponse comportementale sont généralement observés suite au choc électrique produit par le contact avec la sonde électrifiée : son enfouissement avec la litière ou l'immobilisation de l'animal, généralement à distance de la sonde. Ces deux stratégies de défense sont interprétées comme des expressions qualitativement différentes d'anxiété; il s'agit de comportement d'évitement, respectivement actif et passif (Legradi *et al*, 2007). Outre ces deux réactions défensives principales d'autres paramètres peuvent également constituer des indices d'anxiété tels que la latence à revenir vers la sonde après le premier choc.

Dans notre étude, le choc électrique déclenche une réponse d'évitement passive chez les rats traités à la cocaïne puisqu'ils passent plus de temps immobiles dans la partie distale de la cage que les rats témoins, qui eux adoptent plutôt une réponse d'évitement active en tentant d'enfouir la sonde. Le temps d'immobilité reste significativement différent entre les deux groupes de rats pendant au moins 28 jours de sevrage, alors que le temps d'enfouissement ne l'est plus au-delà de 2 jours. L'adoption d'un comportement passif plutôt qu'actif dans ce test peut être liée à nos conditions expérimentales. En effet, il a été rapporté que le degré d'enfouissement dépend de nombreuses variables procédurales (le type et l'intensité du

stimulus aversif, la qualité de la litière, la taille et la familiarité du dispositif) et des caractéristiques des animaux utilisés (en particulier, souches et conditions d'élevage) (De Boer and Koolhaas, 2003). En se basant sur l'augmentation du temps d'immobilité et de la latence à revenir vers la sonde électrifiée (significativement plus longue chez les rats sevrés à 8 et 28 jours de sevrage), nous pouvons conclure que les rats traités à la cocaïne sont plus anxieux que les rats témoins.

L'augmentation de l'état anxieux chez les animaux sevrés de cocaïne a été observée par plusieurs équipes en utilisant ce test (Aujla *et al*, 2008; Harris and Aston-Jones, 1993; Harris *et al*, 2001). Cependant, une seule équipe a étudié son évolution au cours du temps après auto-administration chronique de cocaïne (Aujla *et al*, 2008). Elle apporte des résultats en accord avec les nôtres puisqu'elle montre que cette exacerbation de l'état anxieux peut se prolonger pendant 42 jours de sevrage.

Il est intéressant de noter que dans le test d'enfouissement défensif l'animal fait face à un stimulus aversif proche et identifié alors que dans le test de l'OA la menace est plus distante et plus diffuse. Les comportements de type anxieux dans le test d'enfouissement défensif, tout comme ceux observés dans l'EPM ou L'OA, sont atténués par l'administration d'anxiolytiques (Gutiérrez-García *et al*, 2006; Violle *et al*, 2006) ce qui suggèrent que ces différents tests comportementaux pourraient refléter des facettes différentes d'un état anxieux.

L'ensemble de ces résultats indique que les rats sevrés ont d'autant plus de difficultés à faire face à une situation que celle-ci est fortement anxiogène (EPM versus OA). Ceci rejoint des données de la littérature montrant qu'au cours du sevrage l'anxiété des rats sevrés est mise en évidence dans des situations fortement anxiogènes telles que le fait d'exposer le rat au test d'enfouissement défensif (Aujla *et al*, 2008; Basso *et al*, 1999) ou à des indices environnementaux rappelant la prise de cocaïne (DeVries and Pert, 1998; Erb *et al*, 2006). D'autre part, nos résultats montrant un état anxieux qui perdure au cours du sevrage ouvrent la possibilité de tester de nouvelles molécules à potentiel anxiolytique non seulement en aigu mais après des traitements sub-chroniques et chroniques.

Nos résultats sont pertinents au vu de ce qui est observé chez l'homme. En effet des études cliniques soulignent une forte réactivité émotionnelle en termes d'anxiété, de réponses cardiovasculaire et neuroendocrinienne chez les usagers de cocaïne en période d'abstinence après visionnage d'images à tonalité négative (Chaplin *et al*, 2010; Fox *et al*, 2008b).

3- 2 Effet d'un sevrage à la cocaïne sur l'état pseudo-dépressif des animaux

L'état pseudo-dépressif a été étudié dans un premier temps par l'évaluation de **l'état résigné** dans le test de la nage forcée. Aucune différence dans le temps d'immobilité (paramètre indicateur d'un état résigné) ni dans les autres paramètres de mesure d'un état résigné, plus indirects, comme le temps de nage ou d'escalade n'a été observée.

Bien que le test de la nage forcée ne permette pas d'évaluer à lui seul pleinement les symptômes de type dépressif, le comportement de résignation est affecté dans différents modèles animaux de dépression comme ceux induits par des stress chroniques répétés ou encore un stress prénatal (Kompagne *et al*, 2008; Renoir *et al*, 2012). Les études ayant utilisé ce test pour évaluer l'état pseudo-dépressif au cours du sevrage à la cocaïne ont rapporté des résultats variables ; en effet, certaines d'entre elles ont montré une augmentation dans le temps d'immobilité chez les rats sevrés dans le test de la nage forcée (Filip *et al*, 2006; Perrine *et al*, 2008) et d'autres n'ont trouvé aucune différence, se rapprochant ainsi de nos résultats (Frankowska *et al*, 2010). Ces différences dans les résultats peuvent être dues aux différences dans les quantités et le pattern d'administration de la cocaïne (administration active versus passive ou quotidienne versus binge).

Le test de la nage forcée est généralement associé au test de préférence pour une boisson sucrée qui permet d'évaluer **l'état d'anhédonie** des animaux, un autre symptôme majeur des troubles dépressifs. Dans plusieurs modèles de dépression chez les rongeurs, comme l'exposition à des stress chroniques, une séparation maternelle ou prénatale ou encore une bulbectomie, la préférence pour une solution sucrée est diminuée (Renoir *et al*, 2012).

Dans nos conditions expérimentales, l'évaluation de l'état hédonique des animaux en cours de sevrage indique qu'une solution de saccharose à 0,5 % conserve la même valeur appétitive pour les rats traités à la cocaïne que pour les rats témoins lorsque celle-ci est accessible sans effort. La préférence pour l'eau sucrée est forte pour les deux groupes de rats (80 % du volume de boisson consommé) et se maintient au cours du traitement et lors du sevrage à la cocaïne suggérant que l'état hédonique des animaux n'est affecté ni par le traitement ni par le sevrage à la cocaïne.

Avant donc de conclure à une absence d'effet sur l'état hédonique au cours du sevrage il serait nécessaire de compléter cette étude en utilisant d'autres tests expérimentaux comme l'autostimulation intracérébrale, ou les tests nécessitant un comportement opérant pour obtenir du sucre. En effet, l'état anhédonique au cours d'un sevrage à la cocaïne ou à d'autres

drogues a surtout été mis en évidence avec la technique d'autostimulation intracérébrale qui consiste à évaluer le seuil de récompense d'un animal en lui donnant la possibilité de s'administrer un courant de faible intensité dans une région cérébrale spécifique ; l'intensité minimale du courant qui induit le comportement d'auto-administration permettant une évaluation de la valeur récompensante de la stimulation perçue (D'Souza and Markou, 2010). D'autre part, Barr et Phillips (1999) ont montré que des rats sevrés à l'amphétamine présentent la même préférence que les rats témoins pour une solution sucrée (4 %) disponible en choix libre dans un biberon mais une motivation plus faible lorsqu'ils doivent appuyer sur un levier pour l'obtenir (Barr and Phillips, 1999). Aussi, il serait intéressant d'étudier dans notre modèle si les rats sevrés gardent la même motivation pour cette boisson sucrée lorsque son accès nécessite la mise en œuvre d'un comportement opérant comme l'appui répété sur un levier, par exemple.

Les études épidémiologiques montrent une forte prévalence des troubles dépressifs parmi les usagers de cocaïne (Rounsaville, 2004; Rubin *et al*, 2007). Cependant, comme pour les troubles anxieux, les mécanismes de co-apparition de ces troubles sont peu connus. En effet, certains proposent que la prise de cocaïne augmente les risques de développer un trouble dépressif et d'autres suggèrent que la dépression est un symptôme préexistant à l'exposition à la drogue et contribue de ce fait à sa prise. Bien que nos résultats suggèrent que l'arrêt de la prise de cocaïne n'induit pas d'état dépressif, du moins dans nos conditions expérimentales, d'autres études sont nécessaires afin de compléter ces données et pouvoir confirmer ou infirmer les résultats obtenus concernant l'état pseudo-dépressif des rats au cours du sevrage à la cocaïne.

3- 3 Conclusion générale

Nos résultats suggèrent que le traitement à la cocaïne a une action plus prononcée sur les mécanismes neuronaux impliqués dans la régulation de l'anxiété que sur ceux impliqués dans la régulation de la dépression et que pendant la période de sevrage les animaux ont d'autant plus de difficultés à faire face aux situations anxiogènes que celle-ci sont aversives. Ils offrent ainsi un modèle expérimental permettant d'étudier les substrats neuronaux sous-tendant l'anxiété exagérée observée au cours du sevrage, ce qui fera l'objet de la 2^{ème} partie de cette thèse.

Chapitre II : Corrélats neuroanatomiques de l'anxiété pathologique induite par un sevrage à la cocaïne

1- Introduction

Dans cette étude, nous avons fait l'hypothèse que l'augmentation de l'état d'anxiété observée après confinement dans un bras ouvert chez les rats sevrés à la cocaïne est sous-tendue par des dysfonctionnements cérébraux qui peuvent être repérés en comparant l'expression des protéines Fos et Zif-268 dans les deux groupes de rats, sevrés et témoins.

Bien que le protocole d'administration de cocaïne utilisé nous ait permis de montrer une augmentation du niveau d'anxiété au cours du sevrage dans les tests de l'OA et de l'enfouissement défensif, nous avons privilégié le test de l'OA pour cette étude neuroanatomique. En effet, le test d'enfouissement défensif est basé sur l'analyse du comportement de l'animal suite à un choc électrique délivré après contact avec une sonde placée dans la cage. Ce test implique donc une stimulation nociceptive pour laquelle les deux groupes d'animaux pourraient avoir une sensibilité différente, mais qui surtout induit l'expression de Fos dans de nombreux circuits neuronaux en relation avec la perception de la douleur, et donc rend plus complexe l'analyse des systèmes neuronaux contribuant plus spécifiquement au développement d'un état anxieux.

Les marqueurs Fos et Zif-268 ont été utilisés pour quantifier les neurones activés après exposition à l'OA. Ceci nous a permis de répondre aux deux questions suivantes :

- Quelles sont les régions cérébrales sollicitées par cette situation anxiogène ?
- Quelles sont les régions cérébrales dont la réactivité dans l'OA est altérée à 2 jours de sevrage de cocaïne ?

2- Résultats

2- 1 Déroulement des expériences

Après une heure d'habituation dans la pièce d'expérimentation, les rats sont placés 5 min dans l'OA puis replacés dans leur cage de stabulation. Deux heures après le test, les rats sont perfusés et les cerveaux prélevés comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes » pour l'étude immunohistochimique.

Pour chaque région quantifiée, quatre groupes de rats sont comparés : les rats traités au NaCl sans et avec exposition à l'OA (NaCl - Basal et NaCl + OA respectivement) et les rats traités

à la cocaïne sans et avec exposition à l'OA (Cocaïne - Basal et Cocaïne + OA respectivement). Les rats qui ne sont pas exposés à l'OA restent dans leur cage de stabulation.

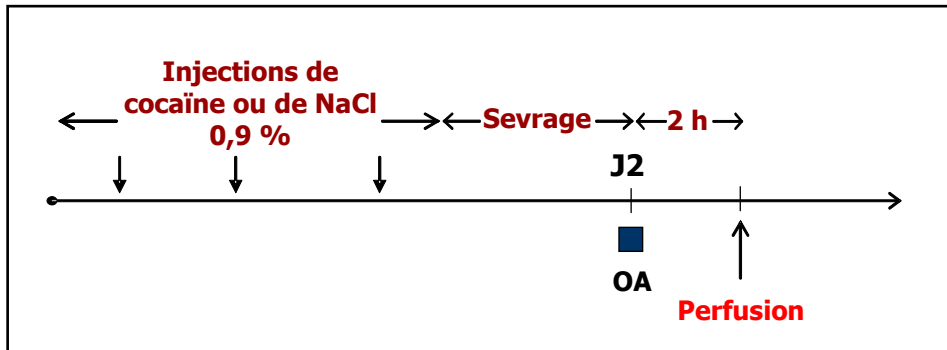


Figure 20 : Protocole expérimental.

Les régions sélectionnées pour la quantification des cellules exprimant Fos sont représentées dans la figure 21. Les cellules exprimant Zif-268 n'ont été quantifiées que dans la partie dorsale du CPFm (dCPFm), qui inclut les cortex cingulaire antérieur et prélimbique dorsal, et différents noyaux de l'amygdale (noyau central, basolatéral, latérodorsal et le noyau principal des masses intercalées).

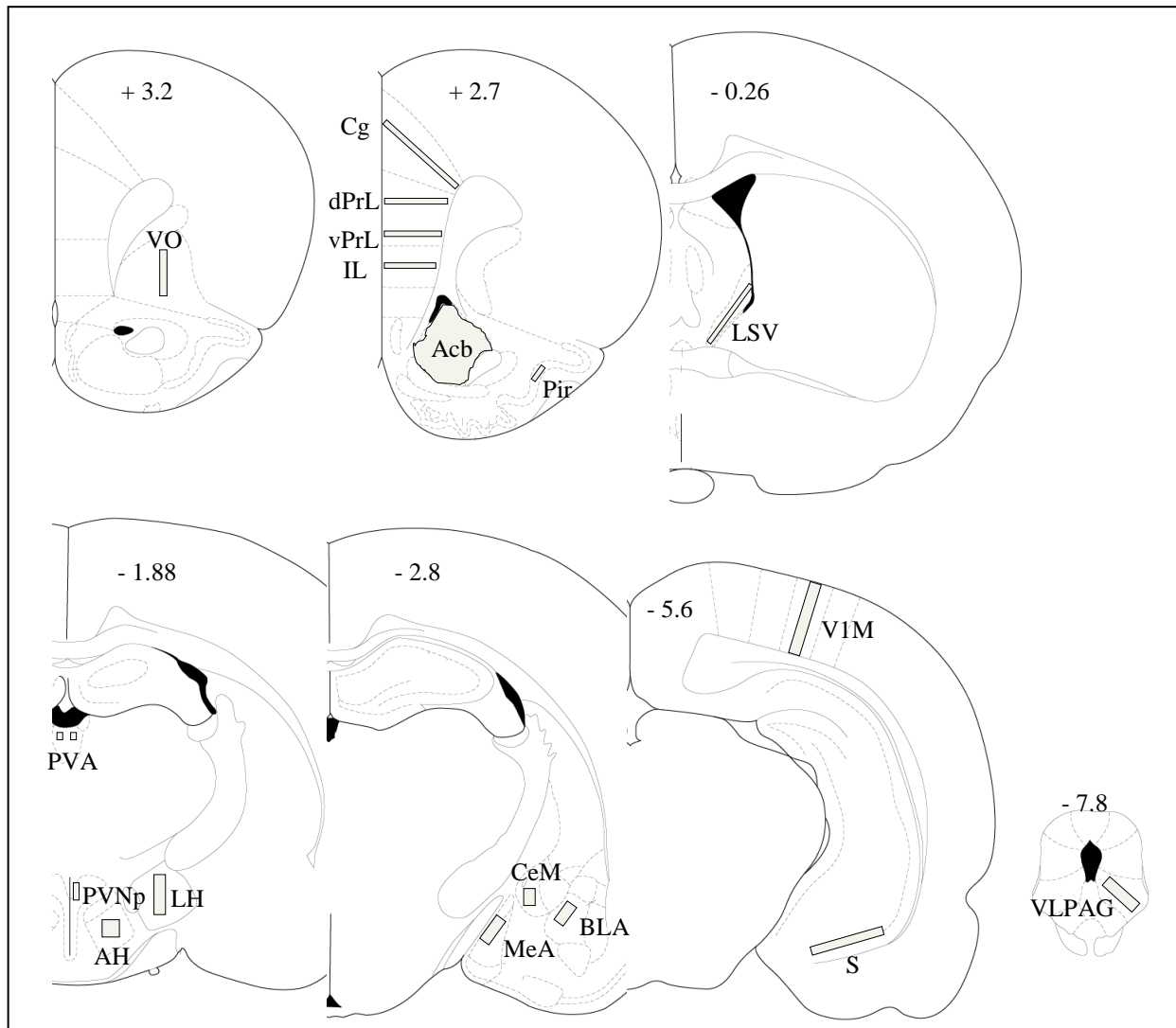


Figure 21 : Diagrammes, adaptés de l'atlas Paxinos et Watson (1998), indiquant l'emplacement des zones utilisées pour la quantification des cellules exprimant les protéines Fos. Bregma 3,2 : **VO**, cortex orbitoventral ; Bregma 2,7 : **Cg**, cortex cingulaire ; **dPrL**, cortex prélimbique dorsal ; **vPrL**, cortex prélimbique ventral ; **IL**, cortex infralimbique ; **Pir**, cortex piriforme ; **Acb**, noyau accumbens ; Bregma - 0,26 : **LSV**, septum latéral ventral ; Bregma - 1,88 : **PVA**, noyau paraventriculaire du thalamus ; **PVNp**, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (partie parvocellulaire) ; **AH**, aire hypothalamique antérieure ; **LH**, aire hypothalamique latérale ; Bregma - 2,8 : **CeM**, noyau central de l'amygdale ; **BLA**, noyau basolatéral de l'amygdale ; **MeA**, noyau médian de l'amygdale ; Bregma - 5,6 : **V1M**, cortex visuel primaire ; **S**, subiculum ; Bregma - 7,8 : **VLPAG**, partie ventrolatérale de la substance grise périaqueducule.

2- 2 Comparaison des patterns d'induction de Fos après confinement dans l'OA chez les deux groupes de rats

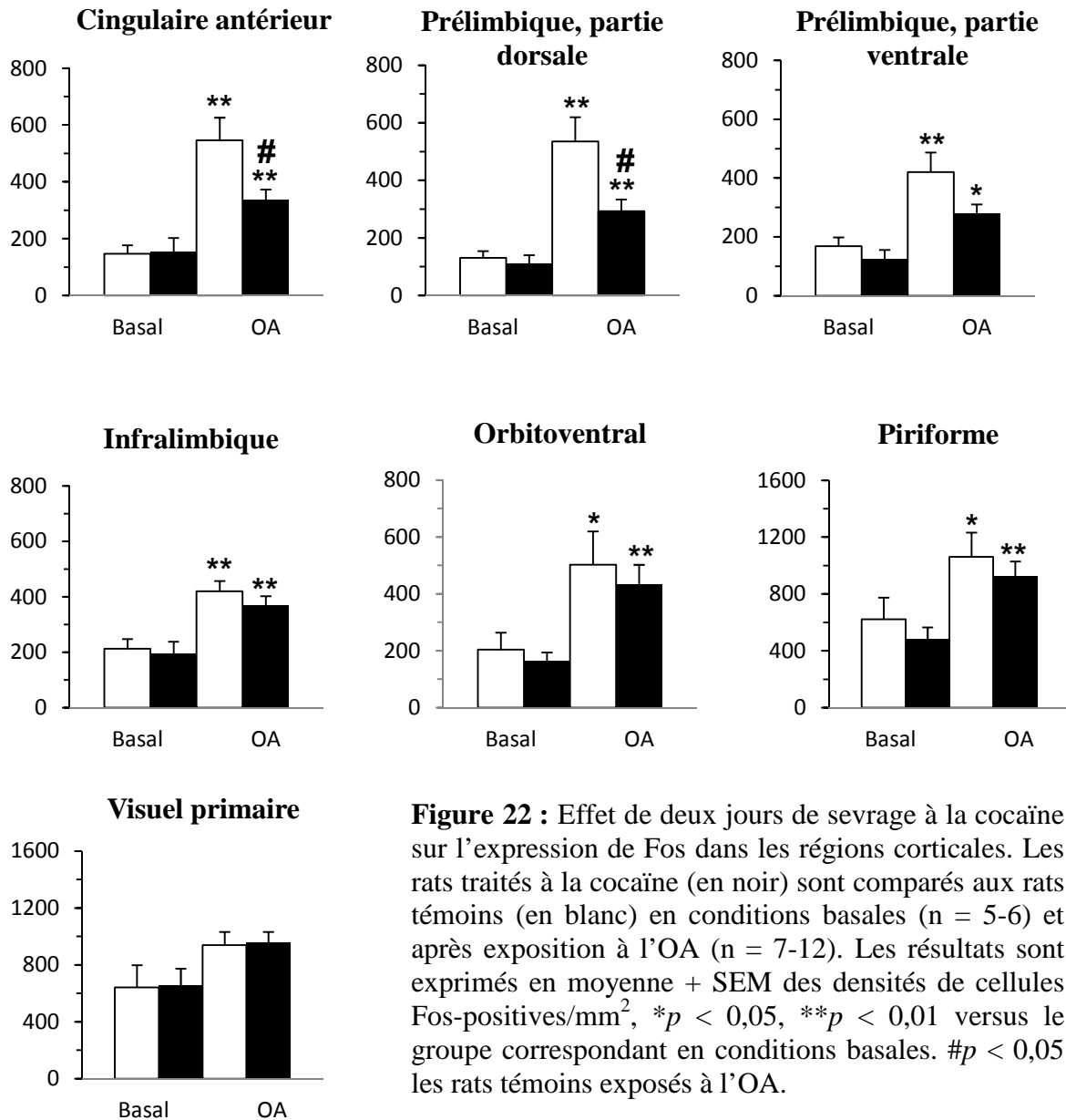
Dans les **conditions basales**, c'est-à-dire lorsque les rats ne sont pas exposés à l'OA, les densités de cellules exprimant la protéine Fos sont relativement faibles dans la majorité des régions examinées (< 200 cellules positives/mm²) à l'exception de trois régions, les cortex piriforme et visuel et le noyau paraventriculaire du thalamus (PVT) où les densités des cellules exprimant Fos sont supérieures à 300 cellules positives/mm². Aucune différence d'expression de Fos n'est observée entre les rats sevrés et les rats témoins dans ces différentes régions (Figures 22 et 23).

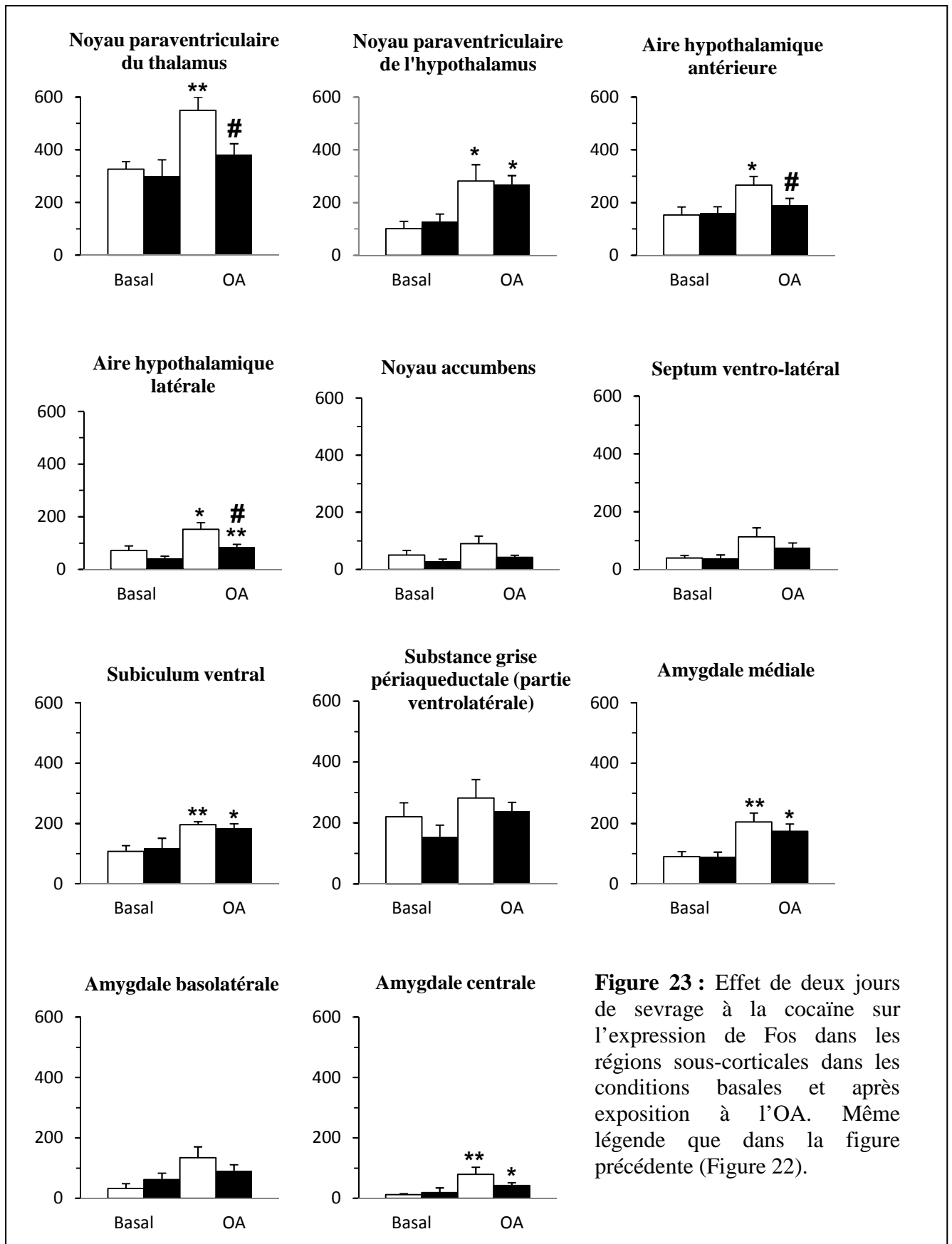
Dans les **régions corticales**, l'exposition à l'OA augmente la densité des cellules Fos-positives dans les différentes subdivisions du CPFm (le cortex cingulaire antérieur, prélimbique dorsal et ventral et le cortex infralimbique), le cortex orbitoventral et le cortex piriforme, et ceci dans les deux groupes de rats sevrés et témoins (Figure 22). Dans le cortex visuel primaire aucune augmentation dans l'expression de Fos après OA n'est observée et ceci dans les deux groupes de rats.

La comparaison entre les deux groupes de rats sevrés et témoins exposés à l'OA révèle des différences d'expression de la protéine Fos. En effet la densité de cellules immunomarquées est significativement plus faible chez les rats en sevrage de cocaïne que chez les rats témoins dans le cortex cingulaire antérieur (38 % de réduction) et la partie dorsale du cortex prélimbique (45 % de réduction). Dans la partie ventrale du cortex prélimbique, une plus faible densité (34 % de réduction) est également observée chez les rats sevrés mais cette différence n'est pas statistiquement significative (Figure 22).

Dans les **régions sous-corticales**, l'exposition à l'OA augmente la densité des cellules Fos-positives dans le PVT, l'hypothalamus (noyau paraventriculaire, aires antérieure et latérale), l'amygdale (médiale et centrale) et le subiculum ventral et ceci dans les deux groupes de rats sevrés et témoins. L'expression de la protéine Fos après OA est significativement plus faible chez les rats sevrés dans 3 régions : le PVT (31 % de réduction), les aires antérieure (29 % de réduction) et latérale (46 % de réduction) de l'hypothalamus.

Dans les autres régions examinées comme le NAC, le septum ventro-latéral, le noyau basolatéral de l'amygdale et la substance grise périaqueducale (PAG), l'expression de Fos n'est pas affectée par l'exposition à l'OA (Figure 23).





2- 3 Comparaison des patterns d'induction de Zif-268 après confinement dans l'OA chez les deux groupes de rats

Nous avons complété cette étude neuroanatomique en examinant l'expression de Zif-268 dans deux structures cérébrales : le dCPFm et le complexe amygdalien. Dans les conditions basales, c'est-à-dire lorsque les rats ne sont pas exposés à l'OA, les densités des cellules exprimant la protéine Zif-268 sont relativement élevées dans la majorité des régions examinées : supérieures à 1400 cellules positives/mm² dans le CPFm et entre 1000 et 3000 cellules positives/mm² dans les différents noyaux de l'amygdale étudiés. Cependant, aucune différence n'est observée entre les rats sevrés et les rats témoins dans ces différentes régions (Figures 24 et 25).

L'exposition à l'OA augmente significativement la densité des cellules exprimant Zif-268 dans le cortex cingulaire antérieur chez des rats témoins. Par contre, aucun changement n'est observé dans les autres régions étudiées.

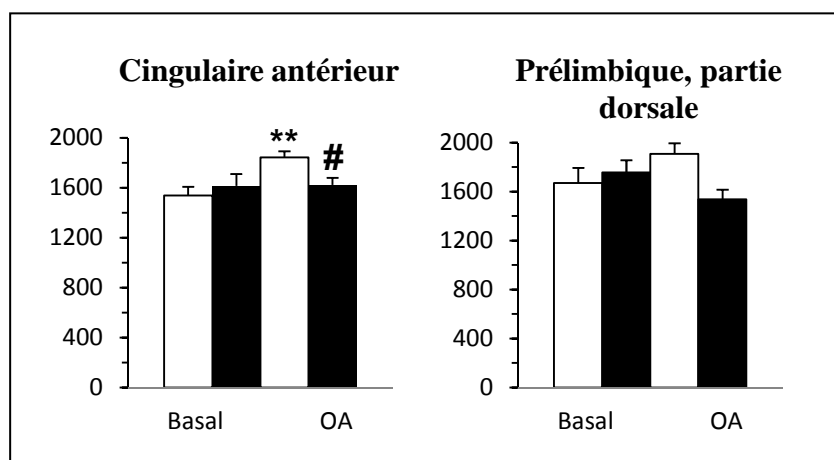
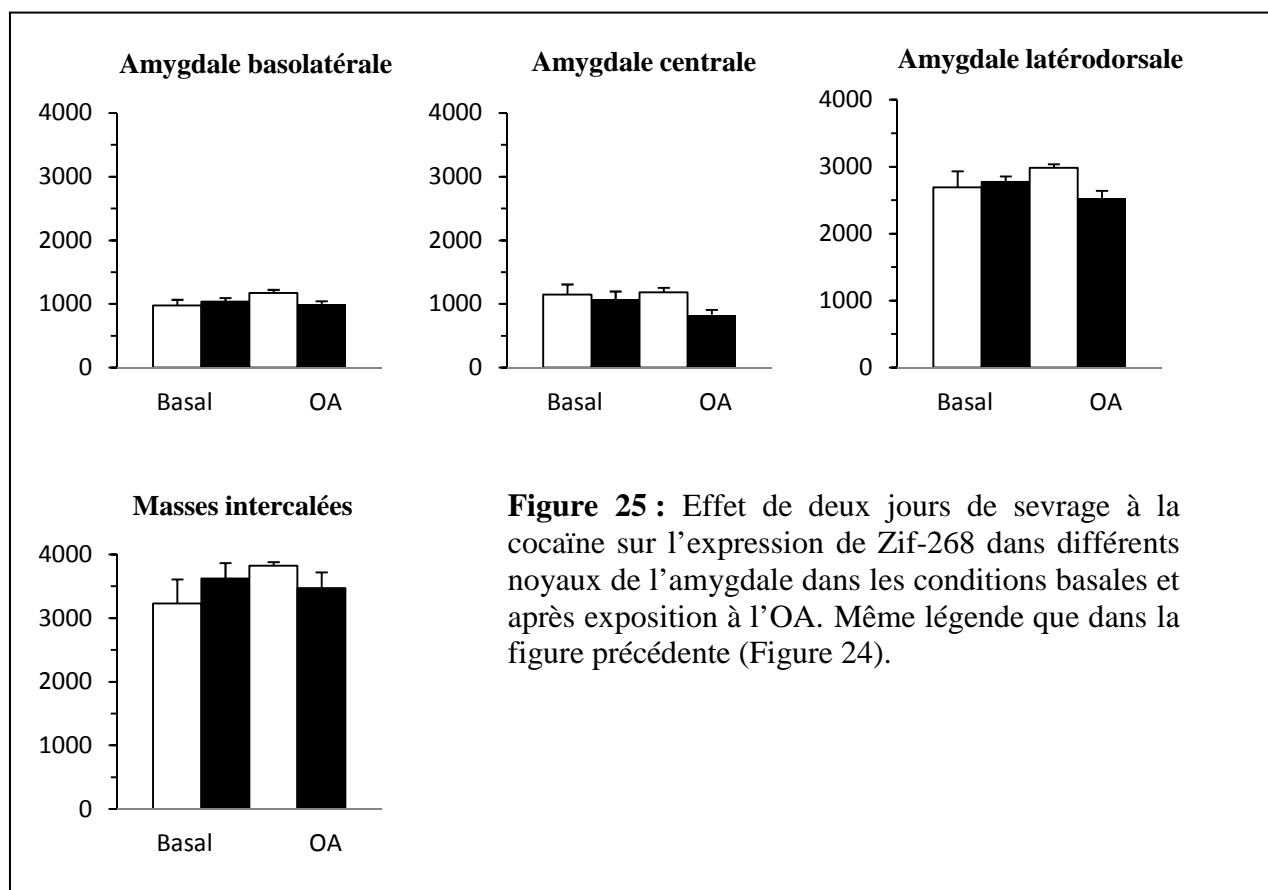


Figure 24 : Effet de deux jours de sevrage à la cocaïne sur l'expression de Zif-268 dans le dCPFm. Les rats traités à la cocaïne (en noir) sont comparés aux rats témoins (en blanc) en conditions basales (n = 5) et après exposition à l'OA (n = 6). Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM des densités de cellules Zif-268 positives/mm², ** $p < 0,01$ versus le groupe correspondant en conditions basales. # $p < 0,05$ les rats témoins exposés à l'OA.



3- Discussion

3- 1 Choix des marqueurs d'activation neuronale, les protéines Fos et Zif-268

La protéine Fos est l'un des facteurs de transcription les plus étudiés et les mieux caractérisés. Elle est faiblement exprimée dans le système nerveux central dans les conditions basales mais peut être induite par un grand nombre de stimuli pharmacologique, électrique ou physiologique. Son induction est rapide et transitoire. Le pic d'expression de l'ARNm codant pour Fos est généralement observé entre 30 et 60 minutes après le stimulus, alors que le taux maximal de la protéine Fos s'observe entre 1 heure et 3 heures après la stimulation et c'est pour cette raison que nous avons choisi de suivre son expression 2 heures après exposition des rats à l'OA.

La protéine Zif-268 est également induite de façon rapide et transitoire dans le cerveau suite à une stimulation cellulaire (Beckmann and Wilce, 1997; Cullinan *et al*, 1995; Knapska and Kaczmarek, 2004; Senba and Ueyama, 1997). Comme Fos, elle est considérée comme un marqueur d'activation neuronale (Hughes and Dragunow, 1995). Cependant Zif-268, à la

différence de Fos, présente une expression constitutive. Cette expression, stable et relativement élevée de la protéine en conditions basales, est maintenue par une production tonique d'ARNm de courte durée de vie en réponse à l'activité synaptique dans plusieurs régions telles que le cortex et le striatum. La protéine Zif-268 peut donc être utilisée pour évaluer l'activité basale dans le cerveau (Worley *et al*, 1991) alors que Fos est un marqueur mieux adapté pour détecter une variation rapide d'activité en réponse à un stimulus.

3- 2 Discussion des résultats obtenus

A notre connaissance, il n'existe aucune étude neuroanatomique exhaustive sur les corrélats neurobiologiques de l'anxiété pathologique induite par un sevrage à la cocaïne. Dans notre étude, l'utilisation de Fos nous a permis d'observer chez les rats non exposés à la cocaïne une activation neuronale dans diverses régions décrites comme étant sollicitées dans des paradigmes d'induction d'anxiété innée comme l'EPM ou l'OA (Duncan *et al*, 1996; Graeff *et al*, 1993; Muigg *et al*, 2008; Salome *et al*, 2004). Ces régions incluent les différentes subdivisions du CPFm, l'amygdale médiale et centrale, le PVT et divers noyaux de l'hypothalamus (PVN, aires latérale et antérieure, paraventriculaire,...).

Il est intéressant de noter que l'observation qualitative et quantitative des coupes montre une similitude dans le « pattern » d'expression de la protéine Fos chez les rats sevrés et les rats témoins confinés à l'OA et que les différences entre les deux groupes d'animaux résident dans l'amplitude de la réactivité de certaines structures comme le dCPFm, le PVT et certaines régions de l'hypothalamus. Ceci suggère que les rats sevrés font intervenir les mêmes circuits neuronaux que les rats témoins lors du traitement de stimuli anxiogènes, comme ceux rencontrés dans l'OA, mais que des altérations fonctionnelles au niveau de certains relais de ce réseau pourraient contribuer à l'augmentation de l'état anxieux observée chez les rats sevrés.

Dans la partie qui suit nous allons commenter les résultats obtenus dans les structures que nous avons quantifiées et qui nous semblent les plus importantes dans le traitement des stimuli anxiogènes.

Les régions corticales

De nombreuses études ont suggéré l'implication du CPFm dans le traitement des informations anxiogènes. En effet différentes situations, comme l'exposition à l'odeur d'un

prédateur (Hebb *et al*, 2004), à un choc électrique (Morrow *et al*, 2000), à l'Open-field (Nagahara and Handa, 1997; Salome *et al*, 2004), à l'OA (Muigg *et al*, 2009; Salome *et al*, 2004) ou encore l'administration d'agents anxiogènes (Singewald *et al*, 2003), augmentent l'expression de Fos dans cette région corticale. L'administration de benzodiazépines prévient l'induction de Fos par des chocs électriques dans cette région (Morrow *et al*, 2000).

Les études neuranatomique et fonctionnelle ont montré qu'il existe un gradient dorso-ventral au sein du CPFm, avec la partie dorsale (incluant le cortex cingulaire antérieur et le cortex prélimbique dorsal) essentiellement interconnectée avec les régions à fonction cognitive alors que la partie ventrale (incluant le cortex prélimbique ventral et le cortex infralimbique) plutôt interconnectée avec les régions régulant le système nerveux autonome et les fonctions viscérales (Heidbreder and Groenewegen, 2003; Hoover and Vertes, 2007; Vertes, 2004). Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de la partie ventrale du cortex préfrontal médian (vCPFm) dans la génération d'un état anxieux. Ces études ont montré que l'inactivation de cette région chez le rat, par des lésions focales ou l'injection locale d'agents pharmacologiques, diminue les comportements anxieux (Shah *et al*, 2004; Stern *et al*, 2010) et réduit les réponses des systèmes autonome (Tavares *et al*, 2009) et neuroendocrinien (Radley *et al*, 2006) à des stress émotionnels aigus. Quant au rôle du dCPFm dans l'anxiété innée, ce dernier est plus controversé puisque les données de la littérature sont assez contradictoires ; certaines rapportent que son inactivation produit un effet anxiogène (Jinks and McGregor, 1997; de Visser *et al*, 2011) et d'autres un effet anxiolytique (Albrechet-Souza *et al*, 2009; Shah *et al*, 2004).

Nos résultats, obtenus avec la protéine Fos, en soulignant une altération sélective de la réactivité du dCPFm en réponse à une situation anxiogène chez les rats sevrés de cocaïne sont intéressants à plusieurs titres :

1- Des études préalables, en utilisant la même approche basée sur l'expression de la protéine Fos, ont également montré une diminution de la réactivité de cette région dans des modèles d'anxiété pathologique chez les rongeurs : les souris BALB/c ayant un trait de caractère hyper-anxieux (Muigg *et al*, 2009; O'Mahony *et al*, 2010) et les lignées de rats ou de souris HAB (Kalisch *et al*, 2004; Muigg *et al*, 2008; Salome *et al*, 2004). Chez ces animaux présentant un trait anxieux, l'induction de l'expression de Fos par un stimulus anxiogène est atténuée dans le dCPFm (notamment dans le cortex cingulaire antérieur), quand ces derniers

sont comparés à leurs homologues hypo-anxieux (respectivement les souris C57BL/6 et les lignées de rats et de souris LAB).

2- L'altération de la réactivité du CPFm que nous avons observé affecte sa partie dorsale impliquée dans les fonctions cognitives et la régulation du comportement émotionnel.

3- Par ailleurs, nos résultats sont intéressants si l'on prend en considération les données cliniques. Les études de neuroimagerie montrent une diminution du métabolisme cellulaire et du flux sanguin dans le cortex cingulaire et orbito-frontal chez les usagers de cocaïne en période d'abstinence (Goldstein and Volkow, 2002; Rogers and Robbins, 2001). De plus, une faible activation du cortex cingulaire antérieur est observée chez ces personnes suite à l'exposition à des situations anxiogènes (par exemple des scènes évoquant des stress personnels) par rapport à des personnes témoins n'ayant jamais consommé la drogue (Goldstein *et al*, 2009; Sinha *et al*, 2005).

La figure 26 illustre deux photographies montrant la densité des cellules Fos dans le cortex cingulaire antérieur chez les deux groupes de rats après exposition à l'OA. Il faut noter que la distribution des cellules Fos dans les différentes couches du CPFm est relativement homogène.

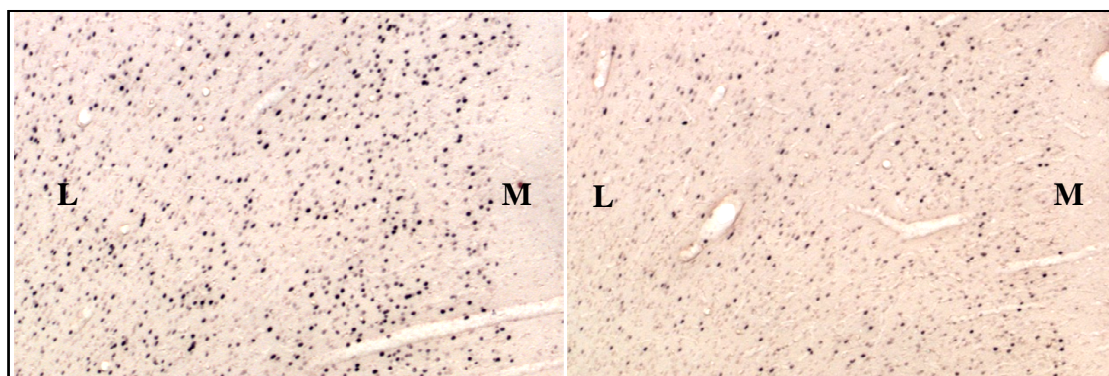


Figure 26 : Microphotographies illustrant la distribution des cellules exprimant Fos dans le cortex cingulaire antérieur chez un rat témoin (à gauche) et un rat sevré de cocaïne (à droite) après exposition à l'OA. **M** : Partie médiale ; **L** : Partie latérale. Objectif $\times 4$.

Alors que les études chez l'homme montrent une diminution de l'activité de base des régions corticales chez les personnes abstinentes de cocaïne, l'étude avec Fos ne donne aucune information sur l'activité basale des neurones de ces régions. Nous avons abordé cette question en quantifiant par immunohistochimie la densité de cellules exprimant la protéine

Zif-268. L'absence de différence dans la densité de cellules exprimant Zif-268 dans les différentes subdivisions du dCPFm entre les rats sevrés et les rats témoins (NaCl versus cocaïne en basal, voir figure 24) suggère que notre traitement chronique à la cocaïne n'induit pas de changement important dans l'activité basale de ces régions. Cependant cette mesure de l'activité basale reste très indirecte et elle pourrait être évaluée de façon plus précise en ayant recours à d'autres méthodes d'analyse comme la quantification histochimique de l'activité de la cytochrome oxydase (très bon marqueur de l'activité en conditions basales) (Hayzoun *et al*, 2007) ou la neuroimagerie fonctionnelle (Hayzoun *et al*, 2007; Kalisch *et al*, 2004).

En conclusion, nos données permettent de proposer que l'altération sélective de la réactivité du dCPFm observée chez les rats sevrés pourrait contribuer à l'expression d'un comportement anxieux exacerbé. Cette question sera abordée dans le chapitre 3 de cette thèse (voir Chapitre 3 : Importance du CPFm dans l'expression de l'état anxieux au cours du sevrage ?).

L'amygdale

L'amygdale est composée de nombreux noyaux et sous-noyaux différenciés sur la base de critères cytoarchitectonique, histochimique et hodologique. Plusieurs de ces noyaux ont été particulièrement impliqués dans le contrôle des processus émotionnels : les **noyaux latéral et basolatéral** considérés comme la voie d'entrée sensorielle de l'amygdale et comme relai dans le traitement d'informations émotionnelles et l'élaboration de réponses comportementales, le **noyau central** de l'amygdale, considéré comme la voie de sortie GABAergique inhibitrice de l'amygdale qui projette vers des régions impliquées dans les différentes réponses émotionnelles et les **masses de cellules intercalées** constituant un réseau GABAergique intrinsèque à cette structure et jouant un rôle modulateur.

Les connections (afférences et efférences) de l'amygdale lui permet d'opérer des liaisons entre les aires corticales et thalamiques qui traitent les informations sensorielles et attentionnelles et les systèmes effecteurs de l'hypothalamus et du tronc cérébral.

Le rôle de l'amygdale a surtout été étudié dans les comportements d'acquisition et d'extinction de la peur mais également dans les comportements anxieux innés. Chez l'animal, il a été établi que les différents noyaux de l'amygdale (basolatéral, central et masses intercalées) sont connectés à différentes sous-régions du cortex préfrontal ainsi qu'à l'hippocampe ventral, et jouent des rôles différents dans la modulation de la réponse à un stimulus anxiogène (Quirk and Beer, 2006; Sierra-Mercado *et al*, 2011). L'inhibition de

l'amygdale médiale ou basolatérale par injection de muscimol par exemple, diminue le comportement de « freezing » de l'animal face une odeur de prédateur (Müller and Fendt, 2006). Il a été également montré que l'altération de l'extinction de la peur chez les rats HAB est associée à une altération de la réactivité des différents noyaux de l'amygdale (Muigg *et al*, 2008).

Dans nos conditions expérimentales, l'exposition à l'OA augmente la densité des cellules exprimant Fos dans l'amygdale médiale et centrale. Cependant aucune différence n'est observée entre les deux groupes de rats sevrés et témoins ce qui peut paraître surprenant, tout au moins au niveau de l'amygdale centrale, compte tenu de sa forte implication dans les réactions émotionnelles. Des résultats analogues ont été observés sur les lignées de rats ou souris HAB exposés à l'OA (Muigg *et al*, 2009; Salome *et al*, 2004). Cette absence de différence a été attribuée à la faible activation de l'amygdale centrale par l'exposition à l'OA, ce qui ne favorise pas la mise en évidence d'altérations à ce niveau.

L'utilisation de la protéine Zif-268 ne nous a pas non plus permis d'observer des différences d'activation entre les deux groupes de rats. Nous suggérons que l'exposition à l'OA n'induit pas une anxiété suffisante pour observer des différences de réactivité dans l'amygdale. Un stress plus fort pourrait révéler des différences de réactivité au niveau de cette structure. En effet, Frank *et al.*, 2006 ont mis en évidence une plus forte activation de l'amygdale centrale et médiale chez les rats HAB par rapport aux rats LAB après une défaite sociale alors que l'exposition à l'OA ne le permettait pas (Frank *et al*, 2006).

Le septum latéral

Le septum est aussi considéré comme une structure clé dans la modulation de l'état anxieux et comme une cible importante de l'action des anxiolytiques (McNaughton and Gray, 2000; Sheehan *et al*, 2004). En effet, l'injection de benzodiazépines dans cette structure diminue le comportement anxieux des animaux dans différents tests comportementaux comme l'EPM ou le test d'enfouissement défensif (Menard and Treit, 1999) confirmant le rôle de cette structure dans la neurobiologie de l'anxiété. Comme dans le CPFm, différentes situations anxiogènes pour les rongeurs comme l'exposition à l'odeur d'un prédateur, à un stress de contention (Chen et Herbert 1995), à l'EPM (Duncan *et al*, 1996), au test de l'Open-field (Nagahara and Handa, 1997) ou encore l'administration de substances anxiogènes augmentent l'expression de Fos à son niveau (Singewald *et al*, 2003).

De plus, il a été proposé que l'activation de la partie ventrale du septum latéral favorise l'adoption de comportements passifs plutôt qu'actifs face à une situation anxiogène (Mongeau *et al*, 2003). Nos résultats révélant la présence de cellules exprimant Fos principalement dans la partie ventrale de cette structure sont en accord avec cette hypothèse. Cependant bien que la densité de ces cellules soit augmentée après exposition à l'OA, cette différence n'est pas significative.

Le noyau paraventriculaire du thalamus

Chez les rongeurs, les études ont montré que le noyau paraventriculaire est une région du thalamus particulièrement intéressante dans l'anxiété de par ses projections vers le cortex préfrontal et l'amygdale et ses fonctions de perception et d'intégration. Le PVT est activé quand les rongeurs sont placés dans des situations anxiogènes telles que l'EPM, l'application d'un choc électrique dans les pattes ou l'administration de drogues anxiogènes (Bubser and Deutch, 1999; Li *et al*, 2010; Singewald *et al*, 2003).

Les études de neuroimagerie chez les primates ont montré que le comportement de « freezing » est associé à une activation du thalamus (Kalin *et al*, 2005) et que cette structure est également activée dans les situations d'anticipation de situations anxiogènes (Choi *et al*, 2012). La résolution anatomique des techniques de neuroimagerie ne permet cependant pas de distinguer les différents noyaux thalamiques.

Dans nos conditions expérimentales, l'exposition à l'OA augmente significativement la densité des cellules Fos-positives dans le PVT chez les rats témoins. Cependant chez les rats sevrés, la densité de cellules Fos-positives reste faible après OA et significativement moins élevée que chez les rats témoins exposés à l'OA. Nos résultats sont intéressants au vu de la littérature puisque les études en neuroimagerie chez les usagers de cocaïne montrent une perturbation de l'activité au niveau du thalamus dans les conditions basales (Gu *et al*, 2010) ainsi qu'en réponse à des tâches impliquant l'attention et la perception de stimuli visuels (Tomasi *et al*, 2007). Ces résultats ne sont pas surprenants étant donné les déficits d'ordre attentionnels observés chez les personnes dépendantes à la cocaïne.

L'hypothalamus

L'hypothalamus est une structure clé dans l'initiation des réponses comportementales et endocriniennes en réponse à des stimuli stressants. Cette structure est subdivisée en plusieurs noyaux dont les plus intéressants par rapport à l'anxiété sont : le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, les aires latérale et antérieure, le noyau dorsomédian et le noyau pré-mamillaire (Motta *et al*, 2009; Nguyen *et al*, 2006; Salomé *et al*, 2006). L'exposition à l'EPM ou l'OA active ces différentes régions de l'hypothalamus chez l'animal (Canteras *et al*, 2010; Duncan *et al*, 1996; Muigg *et al*, 2009; Salome *et al*, 2004).

Notre étude montre, comme attendu, une activation des neurones du noyau paraventriculaire et des aires antérieure et latérale de l'hypothalamus dans les deux groupes de rats après exposition à l'OA. Chez les rats sevrés de cocaïne, une diminution de l'activation est observée dans les aires antérieure et latérale de l'hypothalamus par rapport aux rats témoins. Si l'on compare nos résultats à ceux obtenus chez les rats et les souris HAB on observe chez ces derniers, contrairement à nos résultats, une activation plus forte de ces aires hypothalamiques que chez leurs homologues (les rats et souris LAB) après exposition à l'OA. Ces divergences peuvent être dues à notre étude traitant d'un cas d'anxiété pathologique particulier puisque lié à un sevrage. Il faut noter que le noyau ventromédian de l'hypothalamus est très faiblement marqué et c'est pour cela qu'il n'a pas fait objet de quantification.

L'hippocampe

Les études chez l'animal mettent l'accent sur le rôle cognitif et mnésique de l'hippocampe dorsal et le rôle de l'hippocampe ventral dans les comportements anxieux. En effet, la lésion ou l'inactivation de l'hippocampe ventral, mais pas dorsal, a un effet anxiolytique sur le comportement des rongeurs (Bannerman *et al*, 2004; Kjelstrup *et al*, 2002; Trent and Menard, 2010). Très récemment Adhikari et al ont montré l'activation synchrone des neurones du CPFm et de l'hippocampe ventral chez les rats placé dans l'EPM (Adhikari *et al*, 2011).

Nos résultats sont en accord avec cette littérature puisque l'on observe un fort marquage dans le subiculum ventral (qui fait partie de l'hippocampe ventral) après exposition à l'OA contrairement à la partie dorsale de l'hippocampe (gyrus denté, subiculum dorsal et corne d'Ammon) où le marquage est très faible (Figure 27). La quantification dans le subiculum ventral montre que l'exposition à l'OA augmente significativement la densité de cellules Fos-

positives dans les deux groupes de rats soulignant l'implication potentielle de cette structure dans nos conditions expérimentales. Cependant aucune différence n'est observée entre les rats sevrés et les rats témoins.

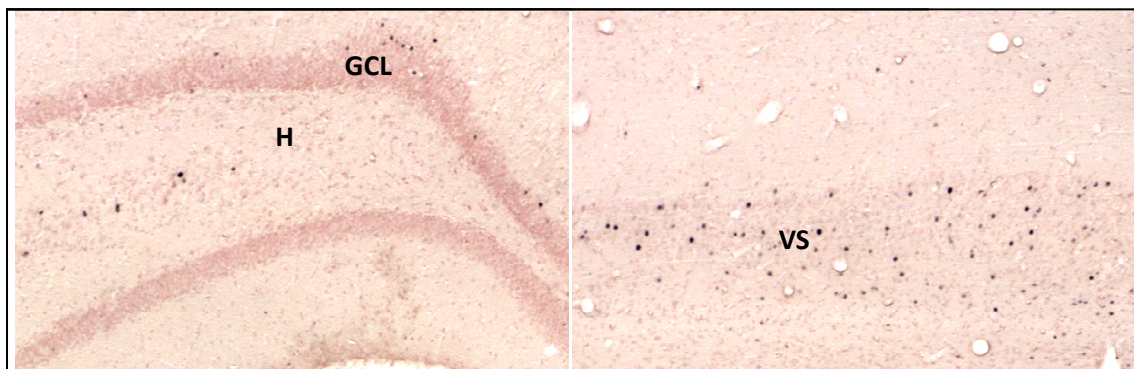


Figure 27 : Microphotographies illustrant la distribution des cellules exprimant Fos dans le gyrus denté dorsal (à gauche) et le subiculum ventral (à droite) d'un rat témoin après exposition à l'OA. **GCL** : couche cellulaire granulaire ; **H** : Hilus ; **VS** : Subiculum ventral. Objectif $\times 4$.

La substance grise périaqueducale

Il a été montré que la PAG est une structure critique dans l'expression des réponses anxieuses. L'activation de Fos dans cette structure a été observée quand les animaux sont exposés à l'odeur d'un prédateur (Canteras and Goto, 1999; Dielenberg *et al*, 2001), à l'Open-field, l'EPM, l'OA (Muigg *et al*, 2009; Salome *et al*, 2004) ou encore après l'administration de molécules anxiogènes comme la yohimbine ou la caféine (Singewald and Sharp, 2000).

Il a été suggéré que selon la stratégie adoptée par l'animal face à une situation anxiogène, différentes parties de la PAG sont sélectivement activées. En effet, la partie ventrolatérale est activée dans des stratégies passives (« freezing », immobilité,...) alors que la partie dorsolatérale, elle, est plutôt activée dans des stratégies actives (confrontation, fuite,...) (Carrive *et al*, 1997; Jhou, 2005; McDannald, 2010).

Ces données nous ont amené à étudier l'expression de Fos dans la partie ventrolatérale de la PAG plutôt que dans les parties dorsolatérale ou dorsale (Figure 28). Cependant nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la densité des cellules exprimant Fos après exposition à l'OA.

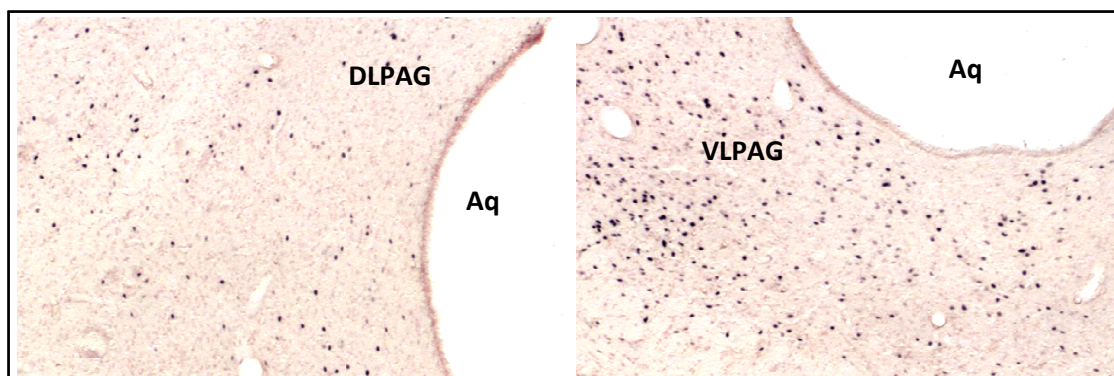


Figure 28 : Microphotographies illustrant la distribution des cellules exprimant Fos dans la PAG dorsolatérale (à gauche) et ventrolatérale (à droite) d'un rat témoin après exposition à l'OA. **DLPAG** : PAG dorsolatérale ; **VLPAG** : PAG ventrolatérale ; **Aq** : Aqueduc. Objectif $\times 4$.

3- 3 Discussion générale

Cette approche neuroanatomique nous a permis de repérer certaines structures cérébrales dont le fonctionnement est altéré lors du traitement d'informations suscitant un état anxieux élevé chez les rats sevrés. Parmi les nombreuses structures cérébrales activées par l'OA seuls **le dCPFm**, le **PVT** et les **aires antérieure et latérale de l'hypothalamus** montrent une réactivité différente chez les rats sevrés par rapport aux rats témoins. Etant donné l'importance du CPFm dans les processus impliqués dans l'anxiété d'une part (Canteras *et al*, 2010; Etkin, 2010) et les importantes altérations fonctionnelles qu'il subit suite à l'exposition chronique à la cocaïne d'autre part (Goldstein and Volkow, 2002; Robinson and Kolb, 2004), nous nous sommes focalisés dans le chapitre suivant sur cette structure qui pourrait jouer un rôle clé dans le contrôle de l'état anxieux chez les rats sevrés.

Chapitre III : Importance du CPFm dans l'expression de l'état anxieux au cours du sevrage ?

1- Introduction

Les résultats obtenus avec l'analyse de l'expression de Fos nous ont permis de mettre en évidence une **altération** de la réactivité du **dCPFm** chez les rats sevrés de cocaïne placés dans une situation anxiogène.

A ce niveau de notre étude il nous est apparu essentiel de répondre à un certain nombre de questions, notamment : Quel est le phénotype des neurones corticaux activés lors d'un confinement dans l'OA ? Est-ce que la différence de densité des cellules corticales exprimant la protéine Fos est affectée par une altération de la densité neuronale ou gliale induite par l'exposition chronique à la cocaïne ? Existe-t-il un lien de causalité entre l'altération de la réactivité du dCPFm et l'expression de l'état anxieux chez les rats sevrés ?

2- Résultats

2- 1 Phénotype des neurones activés par une exposition à l'OA et impact d'un traitement chronique à la cocaïne sur la densité neuronale et gliale dans le CPFm

L'identification du phénotype des neurones corticaux activés par l'OA a été réalisée avec des doubles marquages couplant l'immunohistochimie de Fos à l'hybridation in situ des ARNm codant pour le vGlut1 ou la GAD (Figure 29). La quantification des cellules doublement marquées indique que l'exposition à l'OA active aussi bien des neurones glutamatergiques (65 % des neurones Fos activés) que des neurones GABAergiques (35 % des neurones Fos activés) chez les rats témoins et que ces pourcentages restent identiques chez les animaux traités à la cocaïne (Tableau 4).

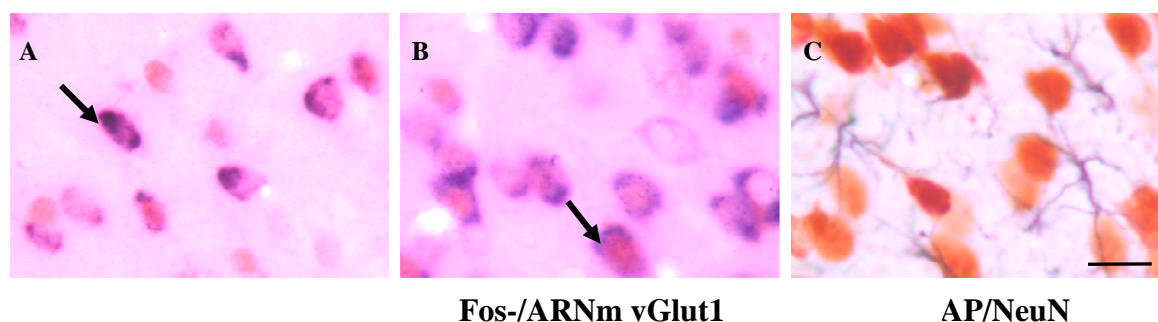


Figure 29: Microphotographies montrant les cellules doublement marquées dans le cortex cingulaire antérieur. Les cellules Fos/ARNm de la GAD et Fos/ARNm du vGlut1 après exposition à l'OA sont représentées respectivement dans les microphotographies A et B. Les flèches indiquent les cellules doublement marquées. La présence de la protéine Fos est révélée par la présence d'un précipité brun et celle des ARNm par un précipité bleu. La microphotographie C illustre la distribution des cellules gliales (en bleu foncé sur la photo) et neuronales (en brun clair sur la photo). Echelle = 20 μ m.

Dans cette étude histologique nous avons également examiné si les nombreuses altérations morphologiques induites par la cocaïne pouvaient modifier la densité des cellules neuronales (cellules exprimant NeuN) et gliales (cellules exprimant GFAP) dans le CPFm et de ce fait, interférer avec notre mesure de la densité de cellules exprimant Fos. La quantification des densités de cellules exprimant NeuN et GFAP n'a révélé aucune différence entre les deux groupes de rats sevrés et témoins et ceci dans les différentes subdivisions du CPFm (Figure 29.C ; Tableau 4).

	Cortex infralimbique		Cortex prélimbique		Cortex cingulaire antérieur	
	Témoins	Cocaïne	Témoins	Cocaïne	Témoins	Cocaïne
NeuN	2275.11 \pm 85.05	2376.12 \pm 120.38	2089.38 \pm 96.64	2218.24 \pm 72.7	1546.26 \pm 46.61	1927.91 \pm 50.18
GFAP	722.19 \pm 77.75	646.03 \pm 62.91	607.13 \pm 77.89	668.25 \pm 134.46	496.23 \pm 60.23	509.4 \pm 32.74
% Fos-GAD	35.46 \pm 4.42	28.32 \pm 2.59	31.05 \pm 3.20	25.22 \pm 2.81	35.26 \pm 8.58	36.52 \pm 6.51
% Fos-vGlut1	65.56 \pm 6.14	66.15 \pm 3.66	71.92 \pm 5.23	78.69 \pm 3.41	75.79 \pm 4.23	79.51 \pm 5.96

Tableau 4 : Densités des neurones et des cellules gliales, et proportions des cellules exprimant Fos et l'ARNm de la GAD ou Fos et l'ARNm du vGlut1 dans le CPFm. La quantification a été réalisée dans les cortex cingulaire, prélimbique et infralimbique chez les deux groupes de rats après exposition à l'OA. Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de trois rats pour chaque groupe et sont exprimées en densité de cellules par mm².

Cette quantification de la densité des neurones corticaux (i.e exprimant NeuN) nous a aussi permis d'évaluer le pourcentage de neurones exprimant Fos dans le CPFm après exposition à l'OA (ratio entre les cellules Fos-positives et les cellules NeuN-positives). Ce pourcentage n'excède pas 30 % dans le cortex cingulaire et 20 % dans les cortex prélimbique et infralimbique chez les rats témoins.

2- 2 Déroulement des expériences d'injections locales de muscimol

Les rats sont injectés avec du muscimol (20 ou 100 ng) ou du NaCl 0,9 % (pour les rats témoins) dans le dCPFm. Trente min après l'injection, les rats sont exposés 5 min à l'OA pour évaluer leur comportement anxieux puis ils sont replacés dans leur cage de stabulation. Deux heures après le test, certains rats sont perfusés et les cerveaux prélevés comme décrit dans la partie « Matériels et méthodes » pour la visualisation de la protéine Fos.

Six groupes de rats sont comparés : les rats traités au NaCl et injectés localement avec du NaCl, 20 ou 100 ng de muscimol (NaCl - NaCl ; NaCl - Muscimol 20 ng ; NaCl - Muscimol 100 ng) et les rats traités à la cocaïne et injectés localement avec du NaCl, 20 ng ou 100 ng de muscimol (Cocaïne - NaCl ; Cocaïne - Muscimol 20 ng ; Cocaïne - Muscimol 100 ng).

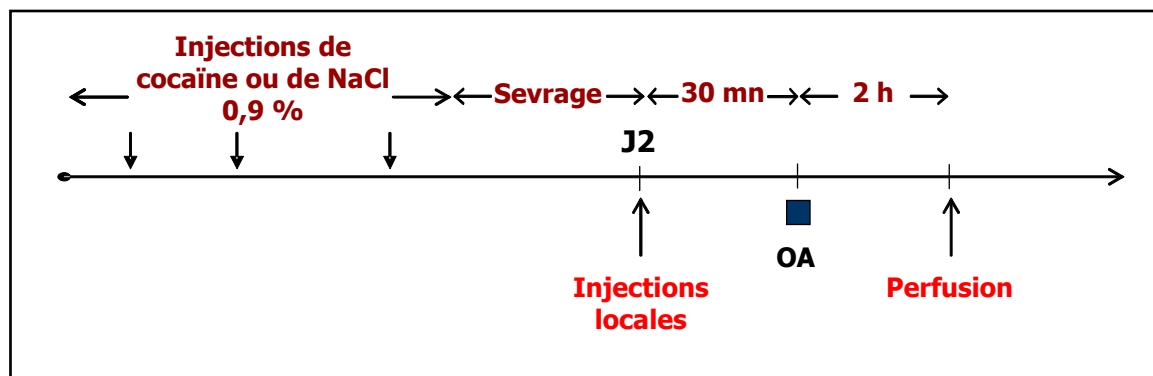


Figure 30 : Protocole expérimental.

2- 3 Effets d'injections de muscimol dans le dCPFm sur le comportement des rats confinés dans l'OA

Les résultats obtenus montrent que les rats sevrés de cocaïne passent significativement plus de temps en postures de « freezing » que les rats témoins (Figure 31. C, NaCl – NaCl versus Cocaïne – NaCl). Les injections bilatérales de 20 ng (Figure 31. A) ou 100 ng (Figure 31. B)

de muscimol dans le dCPFm abolissent complètement les postures de « freezing » chez les rats sevrés (Figure 31. C, Cocaïne - Muscimol 20 ng et Cocaïne – Muscimol 100 ng).

Parallèlement on observe que les rats sevrés de cocaïne effectuent moins d'entrées dans la partie distale du bras ouvert (partie la plus anxiogène du dispositif) que les rats témoins (Figure 31. D, NaCl – NaCl versus Cocaïne – NaCl). L'injection de 20 ou 100 ng de muscimol dans le dCPFm rétablit le nombre d'entrées dans la partie distale à un niveau identique à celui des animaux témoins (Figure 31. D, Cocaïne – Muscimol 20 ng et Cocaïne – Muscimol 100 ng).

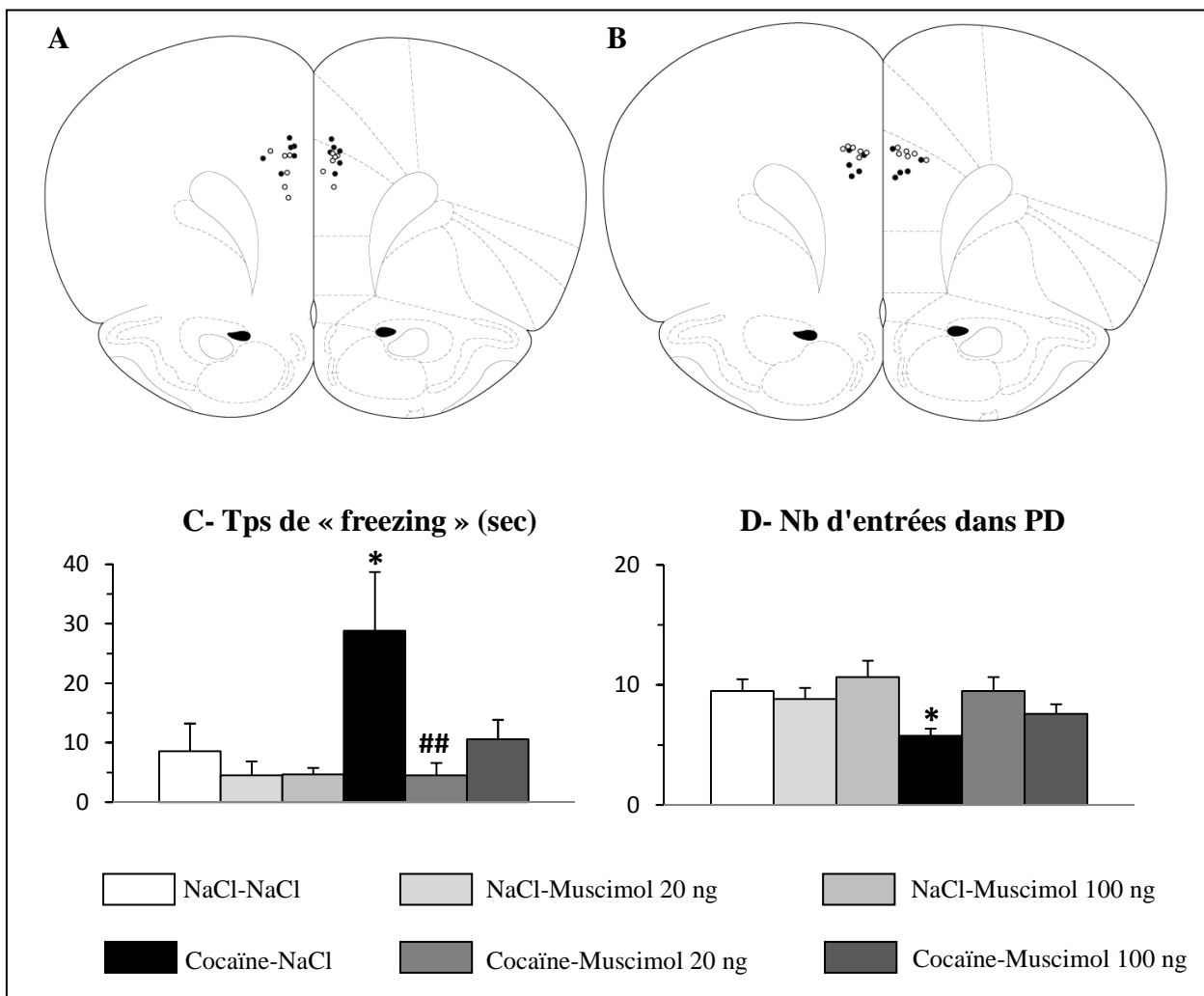


Figure 31 : Effets de l'injection de muscimol dans le CPFm dorsal sur les comportements anxieux dans l'OA. Emplacements des sites d'injection chez les rats sevrés (cercles noirs) ou les rats témoins (cercles blancs) après injections de 20 (A, n = 6) ou 100 ng de muscimol (B, n = 5-6). C et D : Paramètres mesurés dans l'OA après injection de muscimol. Les valeurs sont présentées en moyenne + SEM, * $p < 0,05$ versus le groupe correspondant de rats témoins, ## $p < 0,01$ versus le groupe de rats sevrés ayant été injectés au NaCl.

On peut constater que les rats en sevrage de cocaïne ne diffèrent pas des rats témoins au niveau du temps passé à faire des « head-scanning » (NaCl : $76 \pm 6,68$ sec ; Cocaïne : $75,08 \pm 10,11$ sec), à la différence de ce qui est observé chez les rats non canulés, ou du pourcentage de temps passé dans la partie distale du bras (NaCl : $48,75 \pm 4,87$; Cocaïne : $50,33 \pm 5,77$).

Par ailleurs, chez les rats traités au NaCl, l'injection de muscimol dans le dCPFm n'a pas d'effet sur les différents paramètres comportementaux mesurés dans l'OA (Figure 31)

2- 4 Vérification de l'étendue des injections de muscimol

Les cerveaux des rats canulés ont été coupés et les coupes colorées au rouge neutre pour vérifier les sites d'implantation des canules. Après analyse des coupes histologiques, les animaux dont la localisation d'un ou des deux sites d'implantation se trouve en dehors de la partie dorsale du CPFm sont exclus. D'autres animaux ont été éliminés en raison d'une hémorragie intracérébrale importante.

Dans un certain nombre de cas, les cerveaux ont été perfusés pour évaluer l'étendue des injections. On remarque qu'à proximité de la zone d'injection du muscimol les cellules exprimant Fos sont peu ou pas présentes, alors que leur densité augmente au fur et à mesure que l'on s'éloigne du site d'injection (Figure 32).

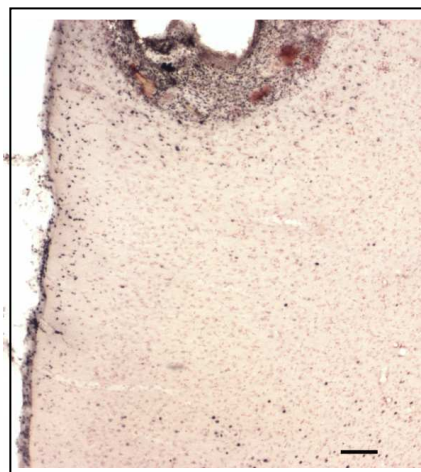


Figure 32 : Microphotographie d'une coupe immunomarquée avec la protéine Fos et illustrant l'étendue d'une injection de 100 ng de muscimol dans le dCPFm. Echelle = 100 μ m.

3- Discussion

Dans cette étude, nous avons tout d'abord montré que l'exposition à l'OA active l'expression de Fos majoritairement dans les neurones glutamatergiques de projection du CPFm (65 à 75 %), le reste des neurones étant des interneurons GABAergiques. Ce ratio, qui concorde avec la proportion estimée de ces deux populations de neurones dans les différentes régions corticales (Santana *et al*, 2004), n'est pas affecté chez des rats sevrés de cocaïne. La cocaïne semble donc ne pas avoir d'action préférentielle sur la réactivité des neurones glutamatergiques ou GABAergiques corticaux impliqués dans les processus anxieux. Il en résulte une diminution du nombre de neurones glutamatergiques de projection du dCPFm exprimant Fos chez les rats sevrés exposés à l'OA, reflétant une altération fonctionnelle de ces voies de sortie qui pourrait contribuer au comportement anxieux exacerbé.

Comme nous l'avons déjà mentionné, de nombreuses études chez l'animal ont rapporté un remodelage important des dendrites des neurones corticaux (Kalivas and O'Brien, 2008; Robinson and Kolb, 2004), des microischémies (Ren *et al*, 2011) ou encore des changements importants du nombre, de la taille et de la forme des cellules gliales (Bowers and Kalivas, 2003) après un traitement chronique à la cocaïne. Nos résultats indiquent que notre traitement à la cocaïne n'induit pas de changements structuraux importants qui auraient pu avoir une incidence sur l'altération de la densité des cellules exprimant Fos observée chez les rats sevrés dans cette région du cortex.

Nous nous sommes ensuite posé la question de la signification fonctionnelle de l'altération de la réponse dans le dCPFm et son implication dans le comportement anxieux chez les rats sevrés. Pour déterminer si un lien de causalité existe entre l'altération de la réactivité dans le cortex et l'expression de l'état anxieux, nous avons eu recours à l'injection locale d'agents pharmacologiques inhibiteur (le muscimol, un agoniste sélectif des récepteurs GABA-A) ou activateur (la picrotoxine, antagoniste sélectif des récepteurs GABA-A) dans le dCPFm afin d'en étudier l'impact sur le comportement anxieux des rats sevrés confinés dans l'OA.

Nous avons commencé nos expériences par des injections bilatérales de 20 et 100 ng de muscimol dans le dCPFm. Nos résultats montrent que l'inactivation transitoire des neurones de cette région avant l'exposition à l'OA a un effet anxiolytique sur le comportement des rats sevrés placés dans ce dispositif. En effet, leur réponse à l'OA devient similaire à celle des rats témoins, i.e on observe une suppression totale des postures de « freezing » et un nombre d'entrées dans la partie distale de l'OA équivalent.

Par contre, chez les rats traités au NaCl, l'injection corticale de muscimol n'affecte aucun des paramètres comportementaux mesurés dans l'OA. Ceci peut être lié au fait que nos animaux témoins sont très peu anxieux (pas de comportement de « freezing », exploration équivalente de la partie distale et proximale de l'OA,...) et que dans ces conditions où le conflit approche/évitement est faible on n'observe pas d'effets des anxiolytiques (Dal-Cól *et al*, 2003; File *et al*, 1993).

L'ensemble de ces données comportementales suggère qu'une **hyperréactivité du dCPFm** en réponse à des stimuli anxiogènes contribue au **comportement anxieux des rats sevrés**. Des études sont actuellement en cours dans notre équipe pour préciser l'étendue de la sphère de diffusion du muscimol et étudier l'effet d'une activation du dCPFm, avec l'injection de picrotoxine, sur le comportement anxieux des rats sevrés placés dans l'OA.

Les données de la littérature sur l'implication du CPFm dans les comportements anxieux chez les rats naïfs sont relativement divergentes. Certaines études ont montré un effet anxiolytique de l'inactivation transitoire du dCPFm dans l'EPM (Albrechet-Souza *et al*, 2009; Shah *et al*, 2004; Stern *et al*, 2010) et d'autres au contraire, un effet anxiogène après lésion de cette région ou inactivation par administration d'agonistes des récepteurs GABA (Jinks and McGregor, 1997; de Visser *et al*, 2011). Ces discordances peuvent être dues au rôle modulateur que détient le dCPFm sur les comportements émotionnels et le fait que son implication peut varier en fonction des situations anxiogènes auxquelles l'animal doit faire face (Vertes, 2006).

Quelques études en neuroimagerie chez l'homme portant sur les corrélats neuronaux de l'anxiété chez les personnes dépendantes à la cocaïne ont rapporté des altérations de la réactivité du cortex cingulaire antérieur lors de la visualisation d'images à tonalité négative. Ces résultats sont parfois contradictoires puisque certaines équipes ont montré une hyperréactivité de cette région corticale et d'autres plutôt une hyporéactivité (Goldstein *et al*, 2009; Potenza *et al*, 2012; Sinha *et al*, 2005). Elles restent cependant difficiles à interpréter car l'anxiété induite dans ces protocoles expérimentaux est le plus souvent associé à un fort désir de drogues (ou « craving ») et qu'il n'est donc pas possible de distinguer si la réactivité du cortex cingulaire antérieur est liée au « craving » et/ou à l'anxiété elle-même.

Si nous mettons en regard nos résultats sur l'**inactivation transitoire du dCPFm** et nos **résultats obtenus avec la protéine Fos**, il n'est pas possible de conclure sur le rôle du

dCPFm dans l'anxiété au cours du sevrage. Nos données neuroanatomiques montrent que la diminution de la densité des cellules exprimant Fos est associée à un comportement anxieux élevé ce qui suggère qu'un déficit d'activation de cette structure participerait à l'expression d'un état anxieux. A l'inverse, les injections corticales de muscimol suggèrent plutôt qu'une hyperréactivité du dCPFm est responsable de l'expression du comportement anxieux observé dans l'OA. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour essayer d'expliquer ces résultats en apparence contradictoires :

- 1) Il a été montré que le facteur de transcription delta Fos B, induit par l'exposition chronique à la cocaïne, s'accumule dans les neurones pendant plusieurs jours après l'arrêt de l'exposition à la drogue (voir Rappels bibliographiques § 1-3-3 Cocaïne et neuroadaptations cérébrales) et peut inhiber l'expression de la protéine Fos (McClung *et al*, 2004b; Perrotti *et al*, 2008; Renthal *et al*, 2008). Si la protéine delta Fos B est exprimée dans les neurones corticaux impliqués dans l'expression de l'anxiété, elle peut être à l'origine de neuroadaptations modifiant la réactivité de ces neurones mais aussi une cause de l'atténuation de la réponse observée avec Fos chez les rats sevrés de cocaïne. Dans ce cas, la diminution de Fos lors de l'exposition à l'OA chez les rats sevrés ne serait pas nécessairement le reflet d'une hyporéactivité.
- 2) On peut aussi supposer que chez les rats sevrés l'exposition à l'OA active une population neuronale dans le dCPFm plus restreinte que chez les rats témoins (d'où la diminution de la densité des cellules exprimant Fos) mais que cette population de neurones soit beaucoup plus active que chez ces derniers.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Comme nous l'avons vu tout le long de ce manuscrit, les périodes initiales d'abstinence à la cocaïne se caractérisent souvent par l'apparition d'un état anxieux, qui par lui-même ou en association avec d'autres facteurs environnementaux, peut favoriser la reprise de la drogue ou la rechute chez les personnes dépendantes. Le traitement de l'anxiété est particulièrement délicat puisque les anxiolytiques les plus couramment utilisés, à savoir les benzodiazépines, ont eux-mêmes un pouvoir addictif très important (Licata and Rowlett, 2008). Ces substances devraient donc idéalement être évitées chez les patients vulnérables à la dépendance aux substances psychoactives. Quant aux antidépresseurs qui se sont montrés efficaces en clinique, ils présentent un délai d'action très lent (plusieurs semaines). Il serait donc important de pouvoir proposer aux usagers un traitement pharmacologique adapté (action rapide et sans effets indésirables) afin d'éviter le recours à d'autres substances à risque addictif (héroïne et alcool) pour soulager cet état. Ceci aurait l'avantage d'éviter le déplacement d'une addiction à une autre et/ou une polytoxicomanie encore plus complexe à traiter.

Dans ce contexte, notre travail basé sur un modèle animal de sevrage à la cocaïne chez le rat a apporté des données nouvelles sur l'évolution des symptômes anxieux au cours des périodes d'abstinence et a montré que ces symptômes sont d'autant plus exacerbés que l'animal doit faire face à une situation fortement anxiogène. Notre travail nous a permis également d'apporter des informations nouvelles sur les substrats neuronaux sous-tendant l'anxiété liée au sevrage à la cocaïne. Nous avons pu notamment mettre en évidence des altérations fonctionnelles importantes au niveau du dCPFm, en s'affranchissant des obstacles communément rencontrés dans les études chez l'homme comme la polytoxicomanie ou la préexistence de troubles psychiatriques divers. Il reste cependant de nombreux points à explorer afin de compléter cette étude et continuer à faire avancer notre problématique.

1) Concernant le **dCPFm** et son **implication dans le contrôle de l'anxiété** manifestée au cours du sevrage, il nous paraît primordial d'effectuer les expériences suivantes :

- Vérifier la sphère de diffusion du muscimol en injectant du muscimol fluorescent (Allen *et al*, 2008) pour s'assurer que dans nos conditions expérimentales nous ciblons spécifiquement le dCPFm, puis compléter l'étude fonctionnelle initiée avec des injections locales de picrotoxine dans le dCPFm comme nous l'avons suggéré dans la discussion du chapitre III.

- Pour ce qui est de l'intervention possible de delta Fos B dans la diminution de l'induction de Fos, nous proposons d'étudier l'expression basale de la protéine delta Fos B à 2 jours de sevrage. Si cette protéine est exprimée dans le CPFm à cette période de sevrage, elle pourrait expliquer en partie la diminution d'expression de Fos observée. Il serait important alors de suivre son expression pendant la période de sevrage (Perrotti *et al*, 2008; Sato *et al*, 2011) et reprendre quelques-unes de nos expériences à une période où elle n'est plus exprimée et qui serait donc plus propice à l'interprétation de nos résultats sur l'induction de Fos par l'exposition à l'OA. Ces expériences sont en cours dans notre équipe.

- Il est possible que l'exposition à l'OA sollicite chez les rats sevrés une population plus restreinte de neurones que chez les rats témoins, mais que cette population neuronale soit hyper-réactive ce qui pourrait concilier l'observation d'une plus faible densité de cellules exprimant Fos chez les rats sevrés et une hyperréactivité du dCPFm au cours du sevrage. Cette hypothèse est par contre plus difficile à tester.

2) **Sur le plan comportemental**, notre étude a permis de révéler une plus grande difficulté à faire face aux situations anxiogènes chez les rats sevrés. Les tests d'anxiété que nous avons utilisés sont basés sur un **conflit approche - évitement** de situations naturellement aversives pour l'animal et il serait donc intéressant d'étendre cette étude à d'autres tests d'anxiété notamment ceux impliquant la **mémoire de peur apprise**. Chez l'homme, le déficit d'extinction de mémoires de peur apprise est considéré comme un symptôme commun aux différentes formes d'anxiété pathologique (Graham and Milad, 2011) d'où l'intérêt majeur de cette étude.

Dans cet objectif, notre équipe a initié un nouveau projet qui s'intitule : « Cocaïne et extinction des mémoires de peur ». Le travail s'effectuera en collaboration avec une équipe de recherche du Centre de Neurosciences de Lyon qui étudie la mémoire émotionnelle (*Equipe du Dr. A.M Mouly*) et abordera l'impact d'une exposition chronique à la cocaïne sur les processus d'acquisition et d'extinction de la peur conditionnée. Très peu d'études se sont intéressées aux performances d'animaux exposés à la cocaïne dans l'apprentissage de peur conditionnée et son extinction (Burke *et al*, 2006; Morrow *et al*, 1995). De même, il existe très peu de données sur le fonctionnement des circuits neuronaux impliqués dans l'extinction de la mémoire de peur chez les animaux traités à la cocaïne.

D'autre part, notre travail s'intègre dans une thématique de recherche plus générale puisque dans notre équipe nous nous intéressons aux relations bidirectionnelles entre exposition à la

cocaïne et symptômes anxio-dépressifs. Nos conditions expérimentales n'ont pas révélé d'effet du traitement chronique à la cocaïne sur les comportements de type dépressif des animaux et comme nous l'avons discuté à la fin du chapitre I il a été suggéré que les symptômes dépressifs observés chez les usagers de cocaïne peuvent être soit une cause soit une conséquence de son utilisation. Pour tenter de répondre à cette question, une étude est en cours dans notre laboratoire afin d'étudier l'appétence et la sensibilisation motrice à la cocaïne chez des souris pseudo-dépressives sélectionnées sur la base de leur comportement résigné dans le test de suspension par la queue (HR pour Helpless Rouen) par rapport à leurs homologues non résignés (NHR pour Non-helpless Rouen). Ce modèle animal de dépression développé par Malika El Yacoubi et Jean-Marie Vaugois (El Yacoubi *et al*, 2003) permettra d'aborder la question du lien entre un phénotype pseudo-dépressif chez l'animal et la vulnérabilité à consommer de la cocaïne (Travail de thèse de Virginie Rappeneau dans le laboratoire).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adhikari A, Topiwala MA, Gordon JA (2011). Single units in the medial prefrontal cortex with anxiety-related firing patterns are preferentially influenced by ventral hippocampal activity. *Neuron* **71**: 898–910.
- Albrechet-Souza L, Borelli KG, Carvalho MC, Brandão ML (2009). The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. *Neuroscience* **164**: 387–397.
- Allen TA, Narayanan NS, Kholodar-Smith DB, Zhao Y, Laubach M, Brown TH (2008). Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. *J Neurosci Methods* **171**: 30–38.
- Amitai N, Semenova S, Markou A (2009). Clozapine attenuates disruptions in response inhibition and task efficiency induced by repeated phencyclidine administration in the intracranial self-stimulation procedure. *Eur J Pharmacol* **602**: 78–84.
- Aujla H, Martin-Fardon R, Weiss F (2008). Rats with extended access to cocaine exhibit increased stress reactivity and sensitivity to the anxiolytic-like effects of the mGluR 2/3 agonist LY379268 during abstinence. *Neuropsychopharmacology* **33**: 1818–26.
- Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, *et al* (2004). Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* **28**: 273–283.
- Barr AM, Phillips AG (1999). Withdrawal following repeated exposure to d-amphetamine decreases responding for a sucrose solution as measured by a progressive ratio schedule of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* **141**: 99–106.
- Barrett AC, Miller JR, Dohrmann JM, Caine SB (2004). Effects of dopamine indirect agonists and selective D1-like and D2-like agonists and antagonists on cocaine self-administration and food maintained responding in rats. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 256–273.
- Basso AM, Spina M, Rivier J, Vale W, Koob GF (1999). Corticotropin-releasing factor antagonist attenuates the “anxiogenic-like” effect in the defensive burying paradigm but not in the elevated plus-maze following chronic cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **145**: 21–30.
- Beckmann AM, Wilce PA (1997). Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int* **31**: 477–510; discussion 517–516.
- Belin D, Berson N, Balado E, Piazza PV, Deroche-Gamonet V (2011). High-novelty-preference rats are predisposed to compulsive cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* **36**: 569–579.
- Belin D, Mar AC, Dalley JW, Robbins TW, Everitt BJ (2008). High impulsivity predicts the switch to compulsive cocaine-taking. *Science* **320**: 1352–1355.
- Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM (1992). Role of monoamine systems in activation of zif268 by cocaine. *J Psychiatry Neurosci* **17**: 94–102.

- Bibb JA, Chen J, Taylor JR, Svenningsson P, Nishi A, Snyder GL, *et al* (2001). Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature* **410**: 376–380.
- Boer SF De, Koolhaas JM (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol* **463**: 145–61.
- Bolla K, Ernst M, Kiehl K, Mouratidis M, Eldreth D, Contoreggi C, *et al* (2004). Prefrontal cortical dysfunction in abstinent cocaine abusers. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* **16**: 456–64.
- Bolton J, Cox B, Clara I, Sareen J (2006). Use of alcohol and drugs to self-medicate anxiety disorders in a nationally representative sample. *J Nerv Ment Dis* **194**: 818–825.
- Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN, Hascöet M (2007). Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* **21**: 567–574.
- Bowers MS, Kalivas PW (2003). Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. *Eur J Neurosci* **17**: 1273–8.
- Brady KT, Verduin ML (2005). Pharmacotherapy of comorbid mood, anxiety, and substance use disorders. *Subst Use Misuse* **40**: 2021–2041, 2043–2048.
- Breslau N, Davis GC, Schultz LR (2003). Posttraumatic stress disorder and the incidence of nicotine, alcohol, and other drug disorders in persons who have experienced trauma. *Arch Gen Psychiatry* **60**: 289–294.
- Bubser M, Deutch AY (1999). Stress induces Fos expression in neurons of the thalamic paraventricular nucleus that innervate limbic forebrain sites. *Synapse* **32**: 13–22.
- Buffalari DM, See RE (2009). Footshock stress potentiates cue-induced cocaine-seeking in an animal model of relapse. *Physiol Behav* **98**: 614–7.
- Burke KA, Franz TM, Gugsä N, Schoenbaum G (2006). Prior cocaine exposure disrupts extinction of fear conditioning. *Learn Mem* **13**: 416–421.
- Campbell-Sills L, Simmons AN, Lovero KL, Rochlin AA, Paulus MP, Stein MB (2011). Functioning of neural systems supporting emotion regulation in anxiety-prone individuals. *Neuroimage* **54**: 689–96.
- Canteras NS, Goto M (1999). Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. *Neuroreport* **10**: 413–418.
- Canteras NS, Resstel LB, Bertoglio LJ, Carobrez A de P, Guimarães FS (2010). Neuroanatomy of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* **2**: 77–96.
- Carrive P, Leung P, Harris J, Paxinos G (1997). Conditioned fear to context is associated with increased Fos expression in the caudal ventrolateral region of the midbrain periaqueductal gray. *Neuroscience* **78**: 165–177.
- Chaplin TM, Hong K, Fox HC, Siedlarz KM, Bergquist K, Sinha R (2010). Behavioral arousal in response to stress and drug cue in alcohol and cocaine addicted individuals versus healthy controls. *Hum Psychopharmacol* **25**: 368–376.
- Chauvet C, Lardeux V, Goldberg SR, Jaber M, Solinas M (2009). Environmental enrichment reduces cocaine seeking and reinstatement induced by cues and stress but not by cocaine. *Neuropsychopharmacology* **34**: 2767–78.

- Chen BT, Bowers MS, Martin M, Hopf FW, Guillory AM, Carelli RM, *et al* (2008). Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* **59**: 288–297.
- Chen NH, Reith ME (1993). Dopamine and serotonin release-regulating autoreceptor sensitivity in A9/A10 cell body and terminal areas after withdrawal of rats from continuous infusion of cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 1445–1453.
- Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou F-M, Ching S, *et al* (2006). Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 9333–9338.
- Chiara G Di (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* **375**: 13–30.
- Chiara G Di, Acquas E, Tanda G, Cadoni C (1993). Drugs of abuse: biochemical surrogates of specific aspects of natural reward? *Biochem Soc Symp* **59**: 65–81.
- Chiara G Di, Bassareo V, Fenu S, Luca MA De, Spina L, Cadoni C, *et al* (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 227–241.
- Chiara G Di, Imperato A (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5274–5278.
- Choi JM, Padmala S, Pessoa L (2012). Impact of state anxiety on the interaction between threat monitoring and cognition. *Neuroimage* **59**: 1912–1923.
- Clark LA, Watson D (1991). Tripartite model of anxiety and depression: psychometric evidence and taxonomic implications. *J Abnorm Psychol* **100**: 316–336.
- Colby CR, Whisler K, Steffen C, Nestler EJ, Self DW (2003). Striatal cell type-specific overexpression of DeltaFosB enhances incentive for cocaine. *J Neurosci* **23**: 2488–2493.
- Cole AJ, Bhat RV, Patt C, Worley PF, Baraban JM (1992). D1 dopamine receptor activation of multiple transcription factor genes in rat striatum. *J Neurochem* **58**: 1420–1426.
- Contoreggi C, Herning RI, Koeppl B, Simpson PM, Negro PJ, Fortner-Burton C, *et al* (2003). Treatment-seeking inpatient cocaine abusers show hypothalamic dysregulation of both basal prolactin and cortisol secretion. *Neuroendocrinology* **78**: 154–62.
- Cooper A, Barnea-Ygael N, Levy D, Shaham Y, Zangen A (2007). A conflict rat model of cue-induced relapse to cocaine seeking. *Psychopharmacology (Berl)* **194**: 117–25.
- Covington HE 3rd, Miczek KA (2003). Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress. *Eur J Pharmacol* **467**: 1–13.
- Cox BJ, Norton GR, Swinson RP, Endler NS (1990). Substance abuse and panic-related anxiety: a critical review. *Behav Res Ther* **28**: 385–393.
- Cruz AP, Frei F, Graeff FG (1994). Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav* **49**: 171–176.

- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* **64**: 477–505.
- Dal-Cól MLC, Pereira LO, Rosa VP, Calixto AV, Carobrez AP, Faria MS (2003). Lack of midazolam-induced anxiolysis in the plus-maze Trial 2 is dependent on the length of Trial 1. *Pharmacol Biochem Behav* **74**: 395–400.
- Davis L, Uezato A, Newell JM, Frazier E (2008). Major depression and comorbid substance use disorders. *Curr Opin Psychiatry* **21**: 14–8.
- Dawson GR, Rupniak NM, Iversen SD, Curnow R, Tye S, Stanhope KJ, *et al* (1995). Lack of effect of CCKB receptor antagonists in ethological and conditioned animal screens for anxiolytic drugs. *Psychopharmacology (Berl)* **121**: 109–117.
- DeVries AC, Pert A (1998). Conditioned increases in anxiogenic-like behavior following exposure to contextual stimuli associated with cocaine are mediated by corticotropin-releasing factor. *Psychopharmacology (Berl)* **137**: 333–40.
- Dembo R, Williams L, Berry E, Getreu A, Washburn M, Wish ED, *et al* (1988). The relationship between physical and sexual abuse and illicit drug use: a replication among a new sample of youths entering a juvenile detention center. *Int J Addict* **23**: 1101–1123.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* **305**: 1014–7.
- Dielenberg RA, Hunt GE, McGregor IS (2001). “When a rat smells a cat”: the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor. *Neuroscience* **104**: 1085–1097.
- Dilleen R, Pelloux Y, Mar AC, Molander A, Robbins TW, Everitt BJ, *et al* (2012). High anxiety is a predisposing endophenotype for loss of control over cocaine, but not heroin, self-administration in rats. *Psychopharmacology* doi:10.1007/s00213-011-2626-4.
- Dong Y, Nasif FJ, Tsui JJ, Ju WY, Cooper DC, Hu X-T, *et al* (2005). Cocaine-induced plasticity of intrinsic membrane properties in prefrontal cortex pyramidal neurons: adaptations in potassium currents. *J Neurosci* **25**: 936–940.
- Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR (1996). Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* **713**: 79–91.
- D’Souza MS, Markou A (2010). Neural substrates of psychostimulant withdrawal-induced anhedonia. *Curr Top Behav Neurosci* **3**: 119–178.
- El Yacoubi M, Bouali S, Popa D, Naudon L, Leroux-Nicollet I, Hamon M, *et al* (2003). Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 6227–6232.
- Enoch M-A (2006). Genetic and environmental influences on the development of alcoholism: resilience vs. risk. *Ann N Y Acad Sci* **1094**: 193–201.
- Erb S, Hitchcott PK, Rajabi H, Mueller D, Shaham Y, Stewart J (2000). Alpha-2 adrenergic receptor agonists block stress-induced reinstatement of cocaine seeking. *Neuropsychopharmacology* **23**: 138–50.

- Erb S, Kayyali H, Romero K (2006). A study of the lasting effects of cocaine pre-exposure on anxiety-like behaviors under baseline conditions and in response to central injections of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Biochem Behav* **85**: 206–13.
- Erb S, Shaham Y, Stewart J (1996). Stress reinstates cocaine-seeking behavior after prolonged extinction and a drug-free period. *Psychopharmacology (Berl)* **128**: 408–12.
- Etkin A (2010). Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. *Curr Top Behav Neurosci* **2**: 251–277.
- Etkin A, Wager TD (2007). Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am J Psychiatry* **164**: 1476–88.
- Feltenstein MW, See RE (2006). Potentiation of cue-induced reinstatement of cocaine-seeking in rats by the anxiogenic drug yohimbine. *Behav Brain Res* **174**: 1–8.
- Fendt M, Endres T, Apfelbach R (2003). Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *J Neurosci* **23**: 23–28.
- Fenton MC, Keyes K, Geier T, Greenstein E, Skodol A, Krueger B, *et al* (2012). Psychiatric comorbidity and the persistence of drug use disorders in the United States. *Addiction* **107**: 599–609.
- File SE, Zangrossi H Jr, Viana M, Graeff FG (1993). Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)* **111**: 491–494.
- Filip M, Faron-Gorecka A, Kusmider M, Golda A, Frankowska M, Dziedzicka-Wasylewska M (2006). Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Res* **1071**: 218–25.
- Flagel SB, Robinson TE (2007). Quantifying the psychomotor activating effects of cocaine in the rat. *Behav Pharmacol* **18**: 297–302.
- Florin SM, Kuczenski R, Segal DS (1994). Regional extracellular norepinephrine responses to amphetamine and cocaine and effects of clonidine pretreatment. *Brain Res* **654**: 53–62.
- Fowler JS, Volkow ND, MacGregor RR, Logan J, Dewey SL, Gatley SJ, *et al* (1992). Comparative PET studies of the kinetics and distribution of cocaine and cocaethylene in baboon brain. *Synapse* **12**: 220–227.
- Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Gatley SJ, Logan J (2001). [(11)]Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. *Nucl Med Biol* **28**: 561–572.
- Fox H, Seo D, Tuit K, Hansen J, Kimmerling A, Morgan PT, *et al* (2012). Guanfacine effects on stress, drug craving and prefrontal activation in cocaine dependent individuals: preliminary findings. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* doi:10.1177/0269881111430746.
- Fox HC, Hong KA, Sinha R (2008a). Difficulties in emotion regulation and impulse control in recently abstinent alcoholics compared with social drinkers. *Addict Behav* **33**: 388–94.

- Fox HC, Hong KI, Siedlarz K, Sinha R (2008b). Enhanced sensitivity to stress and drug/alcohol craving in abstinent cocaine-dependent individuals compared to social drinkers. *Neuropsychopharmacology* **33**: 796–805.
- Fox HC, Talih M, Malison R, Anderson GM, Kreek MJ, Sinha R (2005). Frequency of recent cocaine and alcohol use affects drug craving and associated responses to stress and drug-related cues. *Psychoneuroendocrinology* **30**: 880–91.
- Frank E, Salchner P, Aldag JM, Salomé N, Singewald N, Landgraf R, *et al* (2006). Genetic predisposition to anxiety-related behavior determines coping style, neuroendocrine responses, and neuronal activation during social defeat. *Behav Neurosci* **120**: 60–71.
- Franklin TR, Acton PD, Maldjian JA, Gray JD, Croft JR, Dackis CA, *et al* (2002). Decreased gray matter concentration in the insular, orbitofrontal, cingulate, and temporal cortices of cocaine patients. *Biol Psychiatry* **51**: 134–42.
- Frankowska M, Golda A, Wydra K, Gruca P, Papp M, Filip M (2010). Effects of imipramine or GABA(B) receptor ligands on the immobility, swimming and climbing in the forced swim test in rats following discontinuation of cocaine self-administration. *Eur J Pharmacol* **627**: 142–9.
- Gawin FH (1991). Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* **251**: 1580–6.
- Gawin FH, Kleber HD (1986). Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers. Clinical observations. *Arch Gen Psychiatry* **43**: 107–113.
- Goeders NE, Clampitt DM, Keller C, Sharma M, Guerin GF (2009). Alprazolam and oxazepam block the cue-induced reinstatement of extinguished cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **201**: 581–8.
- Goldstein RZ, Alia-Klein N, Tomasi D, Carrillo JH, Maloney T, Woicik PA, *et al* (2009). Anterior cingulate cortex hypoactivations to an emotionally salient task in cocaine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 9453–8.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* **159**: 1642–52.
- Goldstein RZ, Volkow ND (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci* **12**: 652–669.
- Goodwin RD, Stayner DA, Chinman MJ, Wu P, Tebes JK, Davidson L (2002). The relationship between anxiety and substance use disorders among individuals with severe affective disorders. *Compr Psychiatry* **43**: 245–52.
- Gorman JM (1996). Comorbid depression and anxiety spectrum disorders. *Depress Anxiety* **4**: 160–168.
- Goussakov I, Chartoff EH, Tsvetkov E, Gerety LP, Meloni EG, Carlezon WA Jr, *et al* (2006). LTP in the lateral amygdala during cocaine withdrawal. *Eur J Neurosci* **23**: 239–250.
- Gozzi A, Tessari M, Dacome L, Agosta F, Lepore S, Lanzoni A, *et al* (2011). Neuroimaging evidence of altered fronto-cortical and striatal function after prolonged cocaine self-administration in the rat. *Neuropsychopharmacology* **36**: 2431–2440.

- Graeff FG, Silveira MC, Nogueira RL, Audi EA, Oliveira RM (1993). Role of the amygdala and periaqueductal gray in anxiety and panic. *Behav Brain Res* **58**: 123–131.
- Graham BM, Milad MR (2011). The study of fear extinction: implications for anxiety disorders. *Am J Psychiatry* **168**: 1255–1265.
- Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6912–6916.
- Gross C, Hen R (2004). The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci* **5**: 545–552.
- Gu H, Salmeron BJ, Ross TJ, Geng X, Zhan W, Stein EA, *et al* (2010). Mesocorticolimbic circuits are impaired in chronic cocaine users as demonstrated by resting-state functional connectivity. *Neuroimage* **53**: 593–601.
- Gutiérrez-García AG, Contreras CM, Mendoza-López MR, Cruz-Sánchez S, García-Barradas O, Rodríguez-Landa JF, *et al* (2006). A single session of emotional stress produces anxiety in Wistar rats. *Behav Brain Res* **167**: 30–35.
- Hall BJ, Pearson LS, Buccafusco JJ (2010). Effect of the use-dependent, nicotinic receptor antagonist BTMPS in the forced swim test and elevated plus maze after cocaine discontinuation in rats. *Neurosci Lett* **474**: 84–7.
- Harris GC, Altomare K, Aston-Jones G (2001). Preference for a cocaine-associated environment is attenuated by augmented accumbal serotonin in cocaine withdrawn rats. *Psychopharmacology (Berl)* **156**: 14–22.
- Harris GC, Aston-Jones G (1993). Beta-adrenergic antagonists attenuate withdrawal anxiety in cocaine- and morphine-dependent rats. *Psychopharmacology (Berl)* **113**: 131–6.
- Harris GC, Hummel M, Wimmer M, Mague SD, Aston-Jones G (2007). Elevations of FosB in the nucleus accumbens during forced cocaine abstinence correlate with divergent changes in reward function. *Neuroscience* **147**: 583–591.
- Harrison PA, Fulkerson JA, Beebe TJ (1997). Multiple substance use among adolescent physical and sexual abuse victims. *Child Abuse Negl* **21**: 529–539.
- Hayzoun K, Lalonde R, Mariani J, Strazielle C (2007). Regional variations of cytochrome oxidase activity in the central auditory system of Reeler-Orl (reeler) mutant mice. *Neurosci Res* **58**: 378–385.
- Hebb ALO, Zacharko RM, Gauthier M, Trudel F, Laforest S, Drolet G (2004). Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice. *Eur J Neurosci* **20**: 2415–2429.
- Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* **27**: 555–79.
- Herdegen T, Leah JD (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* **28**: 370–490.

- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, *et al* (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* **21**: RC181.
- Hinks GL, Brown P, Field M, Poat JA, Hughes J (1996). The anxiolytics CI-988 and chlordiazepoxide fail to reduce immediate early gene mRNA stimulation following exposure to the rat elevated X-maze. *Eur J Pharmacol* **312**: 153–161.
- Hiroi N, Brown JR, Haile CN, Ye H, Greenberg ME, Nestler EJ (1997). FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10397–10402.
- Hoover WB, Vertes RP (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* **212**: 149–79.
- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992). Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5764–5768.
- Howell LL, Kimmel HL (2008). Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochem Pharmacol* **75**: 196–217.
- Hughes P, Dragunow M (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* **47**: 133–178.
- Hyman SE (2005). Addiction: a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry* **162**: 1414–1422.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* **29**: 565–598.
- Ikemoto S (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* **56**: 27–78.
- Ikemoto S (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev* **35**: 129–150.
- Imperato A, Mele A, Scrocco MG, Puglisi-Allegra S (1992). Chronic cocaine alters limbic extracellular dopamine. Neurochemical basis for addiction. *Eur J Pharmacol* **212**: 299–300.
- Jaber M, Cador M, Dumartin B, Normand E, Stinus L, Bloch B (1995). Acute and chronic amphetamine treatments differently regulate neuropeptide messenger RNA levels and Fos immunoreactivity in rat striatal neurons. *Neuroscience* **65**: 1041–1050.
- Jacobsen LK, Southwick SM, Kosten TR (2001). Substance use disorders in patients with posttraumatic stress disorder: a review of the literature. *Am J Psychiatry* **158**: 1184–1190.
- Jhou T (2005). Neural mechanisms of freezing and passive aversive behaviors. *J Comp Neurol* **493**: 111–114.
- Jinks AL, McGregor IS (1997). Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res* **772**: 181–190.
- Johanson CE, Fischman MW (1989). The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev* **41**: 3–52.

- Julien JF, Legay F, Dumas S, Tappaz M, Mallet J (1987). Molecular cloning, expression and in situ hybridization of rat brain glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Neurosci Lett* **73**: 173–180.
- Kalin NH, Shelton SE, Fox AS, Oakes TR, Davidson RJ (2005). Brain regions associated with the expression and contextual regulation of anxiety in primates. *Biol Psychiatry* **58**: 796–804.
- Kalisch R, Salomé N, Platzer S, Wigger A, Czisch M, Sommer W, *et al* (2004). High trait anxiety and hyporeactivity to stress of the dorsomedial prefrontal cortex: a combined phMRI and Fos study in rats. *Neuroimage* **23**: 382–391.
- Kalivas PW, Duffy P (1993). Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. I. Dopamine axon terminals. *J Neurosci* **13**: 266–275.
- Kalivas PW, O'Brien C (2008). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* **33**: 166–80.
- Kandel DB, Johnson JG, Bird HR, Canino G, Goodman SH, Lahey BB, *et al* (1997). Psychiatric disorders associated with substance use among children and adolescents: findings from the Methods for the Epidemiology of Child and Adolescent Mental Disorders (MECA) Study. *J Abnorm Child Psychol* **25**: 121–132.
- Kasanetz F, Deroche-Gamonet V, Berson N, Balado E, Lafourcade M, Manzoni O, *et al* (2010). Transition to addiction is associated with a persistent impairment in synaptic plasticity. *Science* **328**: 1709–1712.
- Keefe KA, Gerfen CR (1995). D1-D2 dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience* **66**: 903–913.
- Kellogg SH, Ho A, Bell K, Schluger RP, McHugh PF, McClary KA, *et al* (2002). The Personality Assessment Inventory Drug Problems Scale: a validity analysis. *J Pers Assess* **79**: 73–84.
- Kelz MB, Chen J, Carlezon WA Jr, Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, *et al* (1999). Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* **401**: 272–276.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* **62**: 593–602.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach H-A, Murison R, Moser EI, Moser M-B (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10825–10830.
- Knapaska E, Kaczmarek L (2004). A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Prog Neurobiol* **74**: 183–211.
- Kompagne H, Bárdos G, Szénási G, Gacsályi I, Hársing LG, Lévy G (2008). Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behav Brain Res* **193**: 311–314.
- Kourrich S, Rothwell PE, Klug JR, Thomas MJ (2007). Cocaine experience controls bidirectional synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **27**: 7921–7928.

- Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW (1991). The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* **14**: 299–302.
- Kupferschmidt DA, Newman AE, Boonstra R, Erb S (2012). Antagonism of cannabinoid 1 receptors reverses the anxiety-like behavior induced by central injections of corticotropin-releasing factor and cocaine withdrawal. *Neuroscience* **204**: 125–133.
- Kupferschmidt DA, Tribe E, Erb S (2009). Effects of repeated yohimbine on the extinction and reinstatement of cocaine seeking. *Pharmacol Biochem Behav* **91**: 473–80.
- Larson EB, Akkentli F, Edwards S, Graham DL, Simmons DL, Alibhai IN, *et al* (2010). Striatal regulation of Δ FosB, FosB, and cFos during cocaine self-administration and withdrawal. *J Neurochem* **115**: 112–122.
- Lee JLC, Ciano P Di, Thomas KL, Everitt BJ (2005). Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. *Neuron* **47**: 795–801.
- Lee K-W, Kim Y, Kim AM, Helmin K, Nairn AC, Greengard P (2006). Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3399–3404.
- Legradi G, Das M, Giunta B, Hirani K, Mitchell EA, Diamond DM (2007). Microinfusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide into the central nucleus of amygdala of the rat produces a shift from an active to passive mode of coping in the shock-probe fear/defensive burying test. *Neural Plast* **2007**: 79102.
- Lejuez CW, Zvolensky MJ, Daughters SB, Bornovalova MA, Paulson A, Tull MT, *et al* (2008). Anxiety sensitivity: a unique predictor of dropout among inner-city heroin and crack/cocaine users in residential substance use treatment. *Behav Res Ther* **46**: 811–8.
- Levine SR, Washington JM, Jefferson MF, Kieran SN, Moen M, Feit H, *et al* (1987). “Crack” cocaine-associated stroke. *Neurology* **37**: 1849–1853.
- Li Y, Li S, Wei C, Wang H, Sui N, Kirouac GJ (2010). Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus mediate anxiety-like responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **212**: 251–265.
- Licata SC, Rowlett JK (2008). Abuse and dependence liability of benzodiazepine-type drugs: GABA(A) receptor modulation and beyond. *Pharmacol Biochem Behav* **90**: 74–89.
- Liebsch G, Linthorst AC, Neumann ID, Reul JM, Holsboer F, Landgraf R (1998). Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology* **19**: 381–396.
- Los Cobos JP De, Siñol N, Trujols J, Bañuls E, Batlle F, Tejero A (2011). Drug-dependent inpatients reporting continuous absence of spontaneous drug craving for the main substance throughout detoxification treatment. *Drug Alcohol Rev* **30**: 403–410.
- Lu L, Shepard JD, Hall FS, Shaham Y (2003). Effect of environmental stressors on opiate and psychostimulant reinforcement, reinstatement and discrimination in rats: a review. *Neurosci Biobehav Rev* **27**: 457–91.
- Lyness WH, Friedle NM, Moore KE (1979). Destruction of dopaminergic nerve terminals in nucleus accumbens: effect on d-amphetamine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* **11**: 553–556.

- Madoz-Gúrpide A, Blasco-Fontecilla H, Baca-García E, Ochoa-Mangado E (2011). Executive dysfunction in chronic cocaine users: an exploratory study. *Drug Alcohol Depend* **117**: 55–58.
- Mairesse J, Viltart O, Salomé N, Giuliani A, Catalani A, Casolini P, *et al* (2007). Prenatal stress alters the negative correlation between neuronal activation in limbic regions and behavioral responses in rats exposed to high and low anxiogenic environments. *Psychoneuroendocrinology* **32**: 765–776.
- Makris N, Gasic GP, Seidman LJ, Goldstein JM, Gastfriend DR, Elman I, *et al* (2004). Decreased absolute amygdala volume in cocaine addicts. *Neuron* **44**: 729–740.
- Malenka RC, Bear MF (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* **44**: 5–21.
- Mameli M, Halbout B, Creton C, Engblom D, Parkitna JR, Spanagel R, *et al* (2009). Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nat Neurosci* **12**: 1036–1041.
- Marie N, Canestrelli C, Noble F (2012). Transfer of neuroplasticity from nucleus accumbens core to shell is required for cocaine reward. *PLoS ONE* **7**: e30241.
- Martin BJ, Naughton BJ, Thirtamara-Rajamani K, Yoon DJ, Han DD, Devries AC, *et al* (2011). Dopamine transporter inhibition is necessary for cocaine-induced increases in dendritic spine density in the nucleus accumbens. *Synapse* **65**: 490–496.
- McClung CA, Utery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004a). DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* **132**: 146–154.
- McClung CA, Utery PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, Nestler EJ (2004b). DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* **132**: 146–54.
- McDannald MA (2010). Contributions of the amygdala central nucleus and ventrolateral periaqueductal grey to freezing and instrumental suppression in Pavlovian fear conditioning. *Behav Brain Res* **211**: 111–117.
- McNaughton N, Gray JA (2000). Anxiolytic action on the behavioural inhibition system implies multiple types of arousal contribute to anxiety. *J Affect Disord* **61**: 161–176.
- Menard J, Treit D (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* **23**: 591–613.
- Moal M Le, Koob GF (2007). Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* **17**: 377–393.
- Molander AC, Mar A, Norbury A, Steventon S, Moreno M, Caprioli D, *et al* (2011). High impulsivity predicting vulnerability to cocaine addiction in rats: some relationship with novelty preference but not novelty reactivity, anxiety or stress. *Psychopharmacology (Berl)* **215**: 721–731.
- Mongeau R, Miller GA, Chiang E, Anderson DJ (2003). Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. *J Neurosci* **23**: 3855–3868.
- Morgan JJ, Curran T (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* **14**: 421–451.

- Morrow BA, Elsworth JD, Lee EJ, Roth RH (2000). Divergent effects of putative anxiolytics on stress-induced fos expression in the mesoprefrontal system of the rat. *Synapse* **36**: 143–154.
- Morrow BA, Taylor JR, Roth RH (1995). Prior exposure to cocaine diminishes behavioral and biochemical responses to aversive conditioning: reversal by glycine/N-methyl-D-aspartate antagonist co-treatment. *Neuroscience* **69**: 233–240.
- Motta SC, Goto M, Gouveia FV, Baldo MVC, Canteras NS, Swanson LW (2009). Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 4870–4875.
- Moussawi K, Pacchioni A, Moran M, Olive MF, Gass JT, Lavin A, *et al* (2009). N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity. *Nat Neurosci* **12**: 182–189.
- Muigg P, Hetzenauer A, Hauer G, Hauschild M, Gaburro S, Frank E, *et al* (2008). Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety--evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur J Neurosci* **28**: 2299–309.
- Muigg P, Scheiber S, Salchner P, Bunck M, Landgraf R, Singewald N (2009). Differential stress-induced neuronal activation patterns in mouse lines selectively bred for high, normal or low anxiety. *PLoS One* **4**: e5346.
- Müller M, Fendt M (2006). Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behav Brain Res* **167**: 57–62.
- Nagahara AH, Handa RJ (1997). Age-related changes in c-fos mRNA induction after open-field exposure in the rat brain. *Neurobiol Aging* **18**: 45–55.
- Nguyen NK, Keck ME, Hetzenauer A, Thoeringer CK, Wurst W, Deussing JM, *et al* (2006). Conditional CRF receptor 1 knockout mice show altered neuronal activation pattern to mild anxiogenic challenge. *Psychopharmacology (Berl)* **188**: 374–385.
- O'Mahony CM, Sweeney FF, Daly E, Dinan TG, Cryan JF (2010). Restraint stress-induced brain activation patterns in two strains of mice differing in their anxiety behaviour. *Behav Brain Res*
- Paine TA, Jackman SL, Olmstead MC (2002). Cocaine-induced anxiety: alleviation by diazepam, but not buspirone, dimenhydrinate or diphenhydramine. *Behav Pharmacol* **13**: 511–23.
- Pascoli V, Turiault M, Lüscher C (2012). Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* **481**: 71–75.
- Paxinos G a. W (1998). The rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Sydney: Academic Press* .
- Pelloux Y, Costentin J, Duterte-Boucher D (2009). Anxiety increases the place conditioning induced by cocaine in rats. *Behav Brain Res* **197**: 311–6.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **14**: 149–167.
- Perrine SA, Sheikh IS, Nwaneshiudu CA, Schroeder JA, Unterwald EM (2008). Withdrawal from chronic administration of cocaine decreases delta opioid receptor signaling and increases anxiety- and depression-like behaviors in the rat. *Neuropharmacology* **54**: 355–64.
- Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, Yazdani S, *et al* (2008). Distinct patterns of DeltaFosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse* **62**: 358–69.

- Phillips ML, Ladouceur CD, Drevets WC (2008). A neural model of voluntary and automatic emotion regulation: implications for understanding the pathophysiology and neurodevelopment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* **13**: 829, 833–857.
- Piazza PV, Deminière J-M, Maccari S, Mormède P, Moal M Le, Simon H (1990). Individual reactivity to novelty predicts probability of amphetamine self-administration. *Behav Pharmacol* **1**: 339–345.
- Pollack MH (2005). Comorbid anxiety and depression. *J Clin Psychiatry* **66 Suppl 8**: 22–29.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1978). “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* **51**: 291–4.
- Post RM, Weiss SR, Pert A (1987). The role of context and conditioning in behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacol Bull* **23**: 425–429.
- Potenza MN, Hong K-IA, Lacadie CM, Fulbright RK, Tuit KL, Sinha R (2012). Neural Correlates of Stress-Induced and Cue-Induced Drug Craving: Influences of Sex and Cocaine Dependence. *The American Journal of Psychiatry* doi:10.1176/appi.ajp.2011.11020289.
- Quirk GJ, Beer JS (2006). Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol* **16**: 723–7.
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* **26**: 12967–76.
- Ren H, Du C, Yuan Z, Park K, Volkow ND, Pan Y (2011). Cocaine-induced cortical microischemia in the rodent brain: clinical implications. *Mol Psychiatry* doi:10.1038/mp.2011.160.
- Ren Z, Sun WL, Jiao H, Zhang D, Kong H, Wang X, *et al* (2010). Dopamine D1 and N-methyl-D-aspartate receptors and extracellular signal-regulated kinase mediate neuronal morphological changes induced by repeated cocaine administration. *Neuroscience* **168**: 48–60.
- Renoir T, Pang TY, Lanfumey L (2012). Drug withdrawal-induced depression: serotonergic and plasticity changes in animal models. *Neurosci Biobehav Rev* **36**: 696–726.
- Renthal W, Carle TL, Maze I, Covington HE, Truong HT, Alibhai I, *et al* (2008). Delta FosB mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure. *J Neurosci* **28**: 7344–9.
- Roberts DC, Koob GF, Klonoff P, Fibiger HC (1980). Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* **12**: 781–787.
- Robinson TE, Kolb B (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 33–46.
- Robison AJ, Nestler EJ (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* **12**: 623–637.
- Rogers RD, Robbins TW (2001). Investigating the neurocognitive deficits associated with chronic drug misuse. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 250–257.

- Roth L, Harbison RD, James RC, Tobin T, Roberts SM (1992). Cocaine hepatotoxicity: influence of hepatic enzyme inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. *Hepatology* **15**: 934–940.
- Rounsaville BJ (2004). Treatment of cocaine dependence and depression. *Biol Psychiatry* **56**: 803–9.
- Rubin E, Aharonovich E, Bisaga A, Levin FR, Raby WN, Nunes EV (2007). Early abstinence in cocaine dependence: influence of comorbid major depression. *Am J Addict* **16**: 283–90.
- Rudoy CA, Bockstaele EJ Van (2007). Betaxolol, a selective beta(1)-adrenergic receptor antagonist, diminishes anxiety-like behavior during early withdrawal from chronic cocaine administration in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**: 1119–29.
- Salome N, Salchner P, Viltart O, Sequeira H, Wigger A, Landgraf R, *et al* (2004). Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol Psychiatry* **55**: 715–23.
- Salomé N, Viltart O, Lesage J, Landgraf R, Vieau D, Laborie C (2006). Altered hypothalamo-pituitary-adrenal and sympatho-adrenomedullary activities in rats bred for high anxiety: central and peripheral correlates. *Psychoneuroendocrinology* **31**: 724–735.
- Samaha A-N, Li Y, Robinson TE (2002). The rate of intravenous cocaine administration determines susceptibility to sensitization. *J Neurosci* **22**: 3244–3250.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004). Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **14**: 1100–9.
- Sarnyai Z, Biro E, Gardi J, Vecsernyes M, Julesz J, Telegdy G (1995). Brain corticotropin-releasing factor mediates “anxiety-like” behavior induced by cocaine withdrawal in rats. *Brain Res* **675**: 89–97.
- Sato SM, Wissman AM, McCollum AF, Woolley CS (2011). Quantitative mapping of cocaine-induced Δ FosB expression in the striatum of male and female rats. *PLoS ONE* **6**: e21783.
- Senba E, Ueyama T (1997). Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res* **29**: 183–207.
- Shah AA, Sjovald T, Treit D (2004). Inactivation of the medial prefrontal cortex with the GABAA receptor agonist muscimol increases open-arm activity in the elevated plus-maze and attenuates shock-probe burying in rats. *Brain Res* **1028**: 112–5.
- Sheehan TP, Chambers RA, Russell DS (2004). Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Brain Res Rev* **46**: 71–117.
- Shelton KL, Hendrick E, Beardsley PM (2004). Interaction of noncontingent cocaine and contingent drug-paired stimuli on cocaine reinstatement. *Eur J Pharmacol* **497**: 35–40.
- Shimamoto A, Debold JF, Holly EN, Miczek KA (2011). Blunted accumbal dopamine response to cocaine following chronic social stress in female rats: exploring a link between depression and drug abuse. *Psychopharmacology (Berl)* **218**: 271–279.
- Sierra-Mercado D, Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011). Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology* **36**: 529–538.

- Singewald N, Salchner P, Sharp T (2003). Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol Psychiatry* **53**: 275–283.
- Singewald N, Sharp T (2000). Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry. *Neuroscience* **98**: 759–770.
- Sinha R, Fuse T, Aubin LR, O'Malley SS (2000). Psychological stress, drug-related cues and cocaine craving. *Psychopharmacology (Berl)* **152**: 140–8.
- Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ (2006). Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* **63**: 324–31.
- Sinha R, Lacadie C, Skudlarski P, Fulbright RK, Rounsaville BJ, Kosten TR, *et al* (2005). Neural activity associated with stress-induced cocaine craving: a functional magnetic resonance imaging study. *Psychopharmacology (Berl)* **183**: 171–80.
- Solinas M, Chauvet C, Thiriet N, El Rawas R, Jaber M (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 17145–17150.
- Stern CA, Monte FH Do, Gazarini L, Carobrez AP, Bertoglio LJ (2010). Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience* **170**: 214–22.
- Stewart J (2000). Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *J Psychiatry Neurosci* **25**: 125–36.
- Swendsen J, Conway KP, Degenhardt L, Glantz M, Jin R, Merikangas KR, *et al* (2010). Mental disorders as risk factors for substance use, abuse and dependence: results from the 10-year follow-up of the National Comorbidity Survey. *Addiction* **105**: 1117–1128.
- Tanabe J, Tregellas JR, Dalwani M, Thompson L, Owens E, Crowley T, *et al* (2009). Medial orbitofrontal cortex gray matter is reduced in abstinent substance-dependent individuals. *Biol Psychiatry* **65**: 160–4.
- Tavares RF, Correa FM, Resstel LB (2009). Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res* **87**: 2601–7.
- Thiel KJ, Sanabria F, Pentkowski NS, Neisewander JL (2009). Anti-craving effects of environmental enrichment. *Int J Neuropsychopharmacol* **12**: 1151–6.
- Thomsen M, Han DD, Gu HH, Caine SB (2009). Lack of cocaine self-administration in mice expressing a cocaine-insensitive dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **331**: 204–211.
- Tomasi D, Goldstein RZ, Telang F, Maloney T, Alia-Klein N, Caparelli EC, *et al* (2007). Thalamo-cortical dysfunction in cocaine abusers: implications in attention and perception. *Psychiatry Res* **155**: 189–201.
- Tranel D, Hyman BT (1990). Neuropsychological correlates of bilateral amygdala damage. *Arch Neurol* **47**: 349–355.
- Trent NL, Menard JL (2010). The ventral hippocampus and the lateral septum work in tandem to regulate rats' open-arm exploration in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* **101**: 141–152.

- Tye KM, Prakash R, Kim S-Y, Fenno LE, Grosenick L, Zarabi H, *et al* (2011). Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature* **471**: 358–362.
- Unal CT, Beverley JA, Willuhn I, Steiner H (2009). Long-lasting dysregulation of gene expression in corticostriatal circuits after repeated cocaine treatment in adult rats: effects on zif 268 and homer 1a. *Eur J Neurosci* **29**: 1615–1626.
- Ungless MA, Whistler JL, Malenka RC, Bonci A (2001). Single cocaine exposure in vivo induces long-term potentiation in dopamine neurons. *Nature* **411**: 583–587.
- Ushijima I, Carino MA, Horita A (1995). Involvement of D1 and D2 dopamine systems in the behavioral effects of cocaine in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **52**: 737–741.
- Valjent E, Aubier B, Corbillé A-G, Brami-Cherrier K, Caboche J, Topilko P, *et al* (2006). Plasticity-associated gene Krox24/Zif268 is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. *J Neurosci* **26**: 4956–4960.
- Vanderschuren LJ, Everitt BJ (2004). Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* **305**: 1017–9.
- Vanderschuren LJMJ, Ciano P Di, Everitt BJ (2005). Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *J Neurosci* **25**: 8665–8670.
- Vertes RP (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* **51**: 32–58.
- Vertes RP (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* **142**: 1–20.
- Vezina P (2004). Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* **27**: 827–39.
- Violle N, Messaoudi M, Lefranc-Millot C, Desor D, Nejdi A, Demagny B, *et al* (2006). Ethological comparison of the effects of a bovine alpha s1-casein tryptic hydrolysate and diazepam on the behaviour of rats in two models of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* **84**: 517–523.
- Visser L de, Baars AM, Klooster J van't, Bos R van den (2011). Transient inactivation of the medial prefrontal cortex affects both anxiety and decision-making in male wistar rats. *Front Neurosci* **5**: 102.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2003). The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* **111**: 1444–51.
- Wagner FA, Anthony JC (2002). From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology* **26**: 479–88.
- Wasserman DA, Havassy BE, Boles SM (1997). Traumatic events and post-traumatic stress disorder in cocaine users entering private treatment. *Drug Alcohol Depend* **46**: 1–8.
- Wise RA, Bozarth MA (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* **94**: 469–492.
- Wolf ME (2002). Addiction: making the connection between behavioral changes and neuronal plasticity in specific pathways. *Mol Interv* **2**: 146–157.

- Worley PF, Christy BA, Nakabeppu Y, Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM (1991). Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5106–5110.
- Yang XM, Gorman AL, Dunn AJ, Goeders NE (1992). Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacol Biochem Behav* **41**: 643–50.
- Young ST, Porrino LJ, Iadarola MJ (1991). Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 1291–1295.
- Zahm DS, Becker ML, Freiman AJ, Strauch S, Degarmo B, Geisler S, *et al* (2010). Fos after single and repeated self-administration of cocaine and saline in the rat: emphasis on the Basal forebrain and recalibration of expression. *Neuropsychopharmacology* **35**: 445–463.
- Zhang J, Zhang L, Jiao H, Zhang Q, Zhang D, Lou D, *et al* (2006). c-Fos facilitates the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *J Neurosci* **26**: 13287–13296.

ANNEXES

Neurobiological correlates of enhanced anxiety observed in cocaine withdrawn rats

Cynthia El Hage^{1, 2, 5}, Virginie Rappeneau^{1, 2, 5}, Adeline Etievant⁵, Anne-Laure Morel^{1, 2, 5},
Hélène Scarna⁵, Luc Zimmer^{3, 4, 5} and Anne Bérod^{1, 2, 5}.

- 1) INSERM, U1028, Lyon Neuroscience Research Center, Physiopathology of the neuronal network responsible for the sleep-waking cycle Team, Lyon, F-69000, France ;
- 2) CNRS, UMR5292, Lyon Neuroscience Research Center, Physiopathology of the neuronal network responsible for the sleep-waking cycle Team, Lyon, F-69000, France ;
- 3) INSERM, U1028, Lyon Neuroscience Research Center, BioRan-Pharmaceutical and neurochemical biomarkers Team, Lyon, F-69000, France ;
- 4) CNRS, UMR5292, Lyon Neuroscience Research Center, BioRan-Pharmaceutical and neurochemical biomarkers Team, Lyon, F-69000, France
- 5) University Lyon 1, Laboratoire de Neuropsychopharmacologie, Lyon, F-69000, France

Corresponding author: anne.berod@univ-lyon1.fr

INSERM U1028, CNRS UMR5292

Lyon Neuroscience Research Center

Physiopathology of the neuronal network responsible for the sleep-waking cycle Team

69373 Lyon, France

Phone number: 33 (4) 78 77 75 53

Short title for online submission: Cocaine-induced anxiety and brain altered reactivity

ABSTRACT

Discontinuation of drug intake in cocaine abusers commonly produces a variety of adverse withdrawal symptoms among which anxiety and depression-related behaviors are prevailing during the initial period of abstinence.

The aim of this study was to provide further insight into the functional neurobiological dysregulations that might contribute to these pathological states. Rats were treated with cocaine or saline for 14 days (20 mg/kg; i.p) and anxiety-related behaviors was assessed in different paradigms (elevated plus-maze (EPM), confinement to an open arm of the EPM and shock-probe burying tests) for up to 4 weeks after withdrawal. We concomitantly assessed depression-like behaviors by the forced swim test and sucrose preference test.

Our results demonstrated that cocaine withdrawal induced persistent heightened levels of anxiety that last for at least 28 days. In contrast, the same treatment did not affect depression-like behaviors. We then used Fos immunohistochemistry to map neuronal activation patterns in withdrawn rats confined to one open arm of an EPM, and a double labeling procedure using Fos immunohistochemistry and in situ hybridization of glutamic acid decarboxylase or vesicular glutamate transporter mRNAs to identify the phenotype of the activated neurons. Our data showed that the exacerbated anxiety observed in cocaine treated-rats exposed to an elevated open arm was accompanied by an altered reactivity of the dorsal medial prefrontal cortex (anterior cingulate and dorsal prelimbic cortices), and subcortical regions such as the paraventricular thalamic nucleus and the lateral and anterior areas of the hypothalamus. In the medial prefrontal cortex, we found that more than 65% of activated neurons were glutamatergic projection neurons whereas the remaining were GABAergic interneurons.

The present study provides new insights on the neural substrate underlying pathological anxiety during cocaine withdrawal.

INTRODUCTION

Cocaine addiction is a chronic brain disorder characterized by compulsive drug use and high risk of relapse. Like other drugs of abuse, cocaine induces both powerful positive reinforcing effects and negative affective states that emerge when access to the drug is prevented. Indeed, discontinuation of drug intake in cocaine abusers commonly produces a variety of adverse withdrawal symptoms, among which sleep disturbances, anxiety and depression-related behaviors are prevailing during the initial period of abstinence [1]. Clinical studies have also revealed a persistent hypersensitivity to stress expressed by greater emotional arousal, enhanced anxiety and endocrine reactivity [2–4]. These psychobiological responses to stress exacerbate with cocaine use [5] and have been suggested to increase drug abuse and relapse in addicts [6–9].

The mechanisms and brain regions underlying dysfunctional aspects of anxiety processing in cocaine abstinent abusers are still poorly understood. Human and animal studies on the processing of negative emotions such as anxiety have implicated several medial prefrontal cortex (mPFC) regions and a set of limbic structures which includes the amygdala, insula as well as interconnected structures such as the hypothalamus [10–12]. Interestingly, neuroimaging studies in abstinent cocaine dependent patients and studies in rodents have consistently pointed to persistent structural and functional alterations not only within the mesolimbic dopamine reward system [13,14] but also in the PFC (especially in the orbitofrontal, cingulate and insular cortices) [15–20] and some of its connected subcortical areas (amygdala, thalamus and hippocampus) [21–23]. The high overlap between the brain regions affected by chronic cocaine exposure and those that are parts of the proposed anxiety circuits suggests that some of them may contribute to the impaired expression and/or regulation of anxiety during cocaine abstinence.

In order to address this issue, we first assessed in rats anxiety-like behaviors in different paradigms (elevated plus-maze (EPM), confinement to an open arm of the EPM and shock-probe burying tests) for up to 4 weeks after withdrawal from chronic cocaine treatment. In addition, we concomitantly assessed depression-like behaviors by the forced swim test and sucrose preference test. Indeed, although the anxiogenic and depressive-like properties of cocaine withdrawal have been documented in numerous animal studies [24–29], the extent to which anxiety-like behaviors persists over a protracted period of withdrawal and its relation with depression-like behaviors remains unclear. We then sought to unravel the neurobiological mechanisms behind the impaired expression and regulation of anxiety levels during withdrawal. We used Fos immunohistochemistry to map neural activation patterns elicited by open arm exposure in withdrawn rats, with specific emphasis on the mPFC and its functional and cellular heterogeneity.

METHODS

Animals

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, France) weighing 200-225 g upon arrival were housed in groups of four and maintained in a temperature-controlled environment on a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7:00 AM) with access to food and water *ad libitum*. Once a day for 5-7 days before the treatment, rats were handled for few minutes to reduce the stressful effects of handling. All experiments were performed between 9:30 AM and 5:00 PM. Independent groups of rats were used for each behavioral test and for each period of withdrawal.

Every effort was made to minimize animal suffering and the number of animals used. All experimental procedures were performed in accordance with the European Community

Council Directives (86/609/EEC) and the French guidelines (Act 87-848 Ministère de l'Agriculture) on the care and use of laboratory animals. The protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of our University

Chronic cocaine treatment

Rats were administered cocaine hydrochloride (COOPER, France) (20 mg/kg; i.p.) or saline (0.9 %) in their home cage once a day for 14 days as previously described [30,28].

Elevated plus-maze

A Plexiglas elevated plus-maze (EPM) consisting of two open (50x10 cm) and two enclosed (50x10x40 cm) arms with a black floor and arranged such as the open arms were opposite to each other was used. The maze was elevated 65 cm above the floor and located inside an isolated room with 10 lux of luminosity in the central zone.

Rats were placed in the central zone facing an open arm and their behaviors videotaped during the 5-min test period. The behavioral parameters scored were the number of entries and the time spent in the open and closed arms (one entry was counted when the rat had all 4 paws in the considered arm). Exploratory movements of the head (head-scanning) and immobility times were also monitored.

Open arm

For this test, one open arm of the EPM was isolated from the central zone and the closed arms of the maze by a 40 cm high wall. The open arm was divided into two equal parts, one proximal and one distal in relation to the high wall. Rats were placed in the middle of the open arm facing the open space. The behavioral parameters scored during 5 min were the number of entries and the time spent in the distal zone of the open arm, the number of head

dips and rearing, and the time spent head-scanning and freezing (defined as complete immobility with the exception of respiratory-related movements).

Shock-probe burying test

The apparatus consisted of a Plexiglas cage (25 cm wide, 41 cm long and 21 cm high) covered with 5-cm deep standard bedding material. A removable, electrified probe (7 cm long, 1.2 cm wide and 0.8 cm high; Intellibio, France) was placed through a hole 2 cm above the bedding material and was connected to a Coulbourn precision shocker (Bilaney Consultant, Germany) calibrated to deliver a shock of 0.5 mA whenever the rat touched it with a forepaw or the snout.

Rats were habituated (3–4 cage mates together) to the apparatus in the absence of the shock probe for 1 h each day for two consecutive days. On the third day, rats were tested individually with the electrified probe in place. Five min after the first shock, the current was turned off and the behaviors scored offline for 15 min following the first shock by an observer unaware of the treatment. Parameters measured were the duration of burying, the latency to return to the probe after the first shock and the total duration of immobility.

Sucrose preference test

Anhedonia was assessed daily during exposure to cocaine and withdrawal by way of the sucrose preference test. Briefly, rats were housed in a single cage and were presented with two pre-weighed bottles containing either a sucrose solution or tap water. Water and sucrose consumption were measured at 10:00 AM each testing day at which time the position of the sucrose bottle (left or right) was reversed to control for side preference. Sucrose preference was calculated as the ratio of sucrose intake to total fluid intake (weights per 24 h).

Forced swim test

The procedure was similar to that described previously [31]. Rats were individually placed in glass cylinders containing water ($25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) at a depth of 35 cm. Two swim sessions were conducted. A 15-min pretest was performed at 24 h of withdrawal followed by a 5-min test 24 h later. The 5-min test was recorded and analyzed by a video-tracking system (Viewpoint, Lyon, France) allowing measurements of the total duration of immobility, swimming and climbing.

Immunohistochemistry

Two hours after the onset of the open arm test, animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg; i.p) and transcardially perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde. Free-floating brain sections were processed using a standard immunohistochemical procedure as previously described [32]. Briefly, a 1-in-8 series of free-floating tissue sections was taken for each rat and incubated overnight with primary antibodies in order to visualize **neuronal nuclei** (NeuN) (1:8000; Chemicon International, USA), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (1:8000, Dakocytomation, Denmark) and Fos (1:5000; SC-52; Santa Cruz Biotechnology, USA). The latter primary antibody reacts with rat Fos protein but not with Fos B and Δ Fos B proteins as tested by western blot (data not shown).

Rats were assigned to four groups: cocaine-treated rats and saline-treated rats exposed to OA; cocaine-treated rats and saline-treated rats taken in their home cage to the experiment room but not exposed to the open arm. In each experiment, sections from rats of the four groups were immunolabeled at the same time.

Fos immunohistochemistry combined with GAD or vGlut1 mRNA in situ hybridization

The antisense glutamic acid decarboxylase (GAD) probe [33] and vesicular glutamate transporter 1 (vGlut1) antisense probe [34] were obtained by in vitro transcription using a nonradioactive digoxigenin RNA labeling kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). The double labeling (Fos immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization) was performed as previously described [35].

Images were captured using a light microscope (Axioskop 2, Carl Zeiss, Germany) equipped with a digital camera (Nikon Coolpix E995, Japan). All images were imported into Adobe Photoshop, adjusted for contrast and luminosity and assembled into plates.

Cell counts

Bright field images of sectioned material were viewed with a Zeiss Axioskop 2 microscope equipped with an X/Y sensitive stage and a video camera connected to a computerized image analysis system (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France). The planes of the analyzed sections were standardized according to the atlas of Paxinos and Watson [36]. The location of the samples used for Fos quantitative analysis is shown in Fig. 3.

The quantification was carried out by first delineating the brain sections and the regions of interest (ROI) at low magnification (x 4 objective). The ROI outlines were further refined under a x 10 objective and labeled cells then counted manually by an observer blind to the experimental groups. For each rat, two sections per structure were quantified bilaterally. The density of labeled cells per mm² was then determined and used to calculate the group means and for statistical analyses.

Statistical analysis

Since our data do not meet the assumptions of normality, they were analyzed by a non parametric Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney *U* test for pairwise comparisons. The sucrose consumption data were analyzed by a two-way ANOVA with one between-subject factor (treatment) and one within-subject factor (time). The level of significance was set at $p < 0.05$. All values were expressed as mean \pm SEM. Staview software was used for these statistical analyses.

RESULTS

Cocaine withdrawal increases anxiety-related behaviors in the open arm and shock probe buying tests

Our results showed that cocaine- and saline-treated rats display no major significant differences in anxiety-related parameters in the EPM after 2 days of withdrawal. No difference was observed in the total number of entries in the open arms, in the percentage of time spent in the open arms (Fig. 1A) or in the immobility time (Fig. 1B). The only significant difference observed was in the time spent head-scanning (Fig. 1C). No significant difference was observed in the total number of entries into open or closed arms (11.42 ± 1.44 vs 10.9 ± 2.03 for saline- and cocaine-treated rats respectively).

The absence of differences in anxiety-related behaviors between cocaine- and saline-treated rats in the EPM led us to postulate that a more anxiogenic environment, such as confinement to the open arm [37] might be more appropriate to reveal behavioral alterations displayed by cocaine withdrawn rats. Two days after the last cocaine injection, rats exhibited longer periods of freezing during the exploration of the open arm (Fig. 1E) and less time head

scanning (Fig. 1F) as well as adopting less rearing positions (9.75 ± 2.19 vs 2.88 ± 0.93 for saline- and cocaine-treated rats respectively; $p < 0.05$) compared to control rats. In contrast, both groups exhibited comparable number of entries in the distal zone of the open arm (13 ± 2 vs 10 ± 1 for saline- and cocaine-treated rats respectively), percentage of time spent in it (Fig. 1D) and number of head dips (16.87 ± 2 vs 13.44 ± 2.35 for saline- and cocaine-treated rats respectively).

Finally, cocaine-treated rats were tested during withdrawal in another well-validated model of anxiety, the shock-probe burying test, allowing the investigation of different aspects of anxiety-induced behavioral reactivity. After receiving a shock from the electrified probe, rats may exhibit a passive or avoidance behavioral response (immobility) or an active defensive burying behaviors directed at the probe. At 2 days of withdrawal, periods of time spent burying the probe were less and periods of immobility longer in cocaine-treated rats compared to saline-treated rats (Fig. 1G and H). This increase in immobility time lasted for up to 28 days of withdrawal. Cocaine withdrawal also significantly increased the latency to return to the probe after the first shock at 7 and 28 days of withdrawal (Fig. 1I).

Cocaine withdrawal does not affect depression-related behaviors

We analyzed whether cocaine withdrawal also modified behaviors in paradigms generally used to model different aspects of depression such as the sucrose preference test and the forced swim test. Naive rats were first exposed to various concentrations of sucrose (0.025, 0.05, 0.1, 0.5, and 0.8%) for 2 days in order to define the concentration allowing an increase or a decrease in sucrose consumption to be measured (Inset Fig. 2A). The sucrose concentration of 0.5% associated with a preference for sucrose of ~70% was chosen. Rats exposed to chronic cocaine displayed no differences in total fluid intake or in sucrose preference during cocaine treatment ($F_{1,10} = 0.89$; ns) or throughout the following 28-day

withdrawal period ($F_{1,8} = 1.10$; ns) (Fig. 2A). In the forced swim test, the immobility, swimming and climbing times were similar in saline- and cocaine-treated rats at 2 days of withdrawal (Fig. 2B).

Cocaine withdrawal alters the neuronal activation profile elicited by open arm exposure

Possible alterations in brain reactivity of cocaine withdrawn rats were explored with the expression of the immediate early gene Fos as a marker of neuronal activation. In basal conditions, i.e. in rats not exposed to the open arm, the densities of Fos-expressing cells were low in most areas examined (< 200 positive cells/mm²), except in the piriform and primary visual cortices and the paraventricular thalamic nucleus where the densities of Fos-expressing cells were around 600 positive cells/mm². There were no significant differences between saline- and cocaine-treated rats in these regions (Figs. 4 and 5).

In cortical areas, exposure to the open arm enhanced the density of Fos-expressing cells in all subdivisions of the mPFC (anterior cingulate, dorsal and ventral prelimbic, infralimbic), ventral orbital and piriform cortices in both groups of rats whereas there was no change in the primary visual cortex (Fig. 4). Two of these 7 quantitatively evaluated areas exhibited a significantly lower Fos response in cocaine withdrawn rats, the anterior cingulate (38 % reduction) and the dorsal prelimbic cortices (45 % reduction) (Fig. 4). In the ventral prelimbic cortex, the Fos response in cocaine withdrawn rats was also lower (34 % reduction) but did not reach statistical significance.

In subcortical areas, open arm exposure enhanced the density of Fos-expressing cells in the paraventricular thalamic nucleus, hypothalamus (paraventricular nucleus, anterior and lateral areas), amygdala (medial and central nuclei) and ventral subiculum in both groups of rats (Fig. 5). It should be noted that in the hippocampal formation, the largest number of Fos-expressing cells after open arm exposure was found in the ventral subiculum where as their

number was very low in the dentate gyrus, the different subfields of Ammons's horn and the dorsal subiculum.

Fos response to open arm exposure was lower in cocaine withdrawn rats in only 3 of these quantitatively evaluated areas: the paraventricular thalamic nucleus (31 % reduction), the anterior (29 % reduction) and lateral (46 % reduction) areas of the hypothalamus (Fig. 5). In other brain regions, such as the rostral nucleus accumbens, lateral septum, basolateral nucleus of the amygdala and periaqueductal gray matter, Fos expression was not significantly affected by the confinement to the open arm.

Cocaine withdrawal similarly affects the reactivity of glutamatergic and GABAergic neurons of the mPFC

We first ensured that the decrease in Fos-expressing cell densities observed in cocaine withdrawn rats was not altered by cortical structural changes in terms of neuronal (NeuN-expressing cells) or astroglial cell (GFAP-expressing cells) packing densities. Our results showed no significant difference in the densities of NeuN- or GFAP-expressing cells in the anterior cingulate, prelimbic or infralimbic cortices of cocaine- and saline-treated rats (Table 1). The quantification of neuronal cell densities in the mPFC allowed us to evaluate the percentage of Fos-reactive cells after open arm exposure (ratio of Fos-expressing cells on NeuN-expressing cells). This percentage did not exceed 30% in the cingulate cortex and 20% in the prelimbic and infralimbic cortices.

We then sought to determine the phenotype of the cortical Fos-activated neurons. Double labeling of Fos-labeled cells with vGlut1 mRNA or GAD mRNA (Fig. 6) indicated that Fos activation occurred in glutamatergic (more than 65% of Fos-activated neurons) as well as GABAergic neurons (about 35% of Fos-activated neurons), percentages that were maintained between groups (Table 1).

DISCUSSION

Two major findings have emerged from the present study. First, we showed that cocaine withdrawal had a sustained effect on anxiety-related behaviors, particularly that in response to highly challenging situations. In contrast, the same treatment did not affect depression-like behaviors suggesting that in our experimental conditions, cocaine had a more profound effect on the mechanisms involved in the regulation of anxiety than those involved in mood regulation. Second, our anatomical data provide new insight into the neural substrates underlying pathological anxiety during cocaine withdrawal. Indeed, we showed that exacerbated anxiety observed in cocaine withdrawn rats placed in an anxiogenic environment was accompanied by dysfunctions within a restricted neural network including the dorsal mPFC and anatomically-related subcortical regions such as the paraventricular thalamic nucleus and specific regions of the hypothalamus.

Our behavioral data increased our knowledge on the affective states induced by withdrawal from chronic cocaine exposure in rodents. While several studies have already reported a similar elevation of anxiety-related behaviors in rodents exposed to the EPM [30,28,29], here we have shown that this effect is more readily observed and more sustained in rats having to cope with a higher anxiogenic environment [37] or an aversive stimulus [38]. This heightened anxiety state was evidenced by long bouts of freezing in the open arm (that persisted for at least 8 days, data not shown) or immobility in the shock probe burying tests that persisted for at least 28 days of withdrawal. These passive behaviors cannot be interpreted as an impaired motor activity since cocaine withdrawn rats exhibited a comparable number of entries into the distal zone of the open arm, or total number of entries into open and closed arms in the EPM. These behavioral findings suggest that cocaine-induced neuroadaptations contribute to long-lasting impairment in the ability to cope with anxiogenic or stressful situations following drug exposure and withdrawal. They support previous observations indicating that persistent

heightened levels of anxiety are expressed after protracted withdrawal periods when rats are placed in highly challenging situations such as that during the defensive burying test procedure [38,25,24] or after exposure to contextual cues previously paired with cocaine [39,40]. Our data are also relevant with regards to clinical studies highlighting a persistent hypersensitivity to stress during abstinence in cocaine abusers [2–4].

In contrast, we found no alterations in behaviors related to depression. We observed no evidence of helplessness or anhedonic states during withdrawal, two different aspects of depression that were respectively assessed by the forced swim test and the sucrose preference test. Previous data addressing this issue have yielded equivocal results, with some reporting no change [41] and others alterations in behaviors in the forced swim test during early phase of cocaine withdrawal [42,43,27]. Regarding anhedonic-like symptoms during cocaine withdrawal, they have been only reported in experiments using the intracranial self-stimulation procedure as a measure of brain reward system function [44]. Thus, the discrepancies observed between the different reports and our data might be due to procedural differences including the amount and pattern of cocaine administration (active vs passive, daily vs binge administrations) and testing procedure. Although we observed no effect of chronic cocaine treatment on depression-related behaviors in our experimental conditions, we may hypothesize that cocaine-induced disruption in anxiety regulation compromises stress coping and increases vulnerability to depression mediated by stressful life events. Further investigations are needed to address this specific issue.

To the best of our knowledge, no previous anatomical study has directly addressed the identification of the neural circuits underpinning the impaired expression or regulation of anxiety observed during cocaine withdrawal. Previous studies aiming at characterizing the neurobiological substrates of cocaine-induced anxiety have focused on the action of different receptors such as corticotropin-releasing factor [29,38], beta-adrenergic [24,34], cannabinoid

[45] and delta opioid [27] receptors. Here, using Fos immunohistochemistry, we showed that open arm exposure activates a large number of cortico-limbic areas also stimulated by different innate anxiety paradigms [46–48]. In addition, we demonstrated that the enhanced anxiety observed in cocaine withdrawn rats was associated with altered neuronal processing in specific key areas of the brain. Indeed, whereas regions such as the central and medial nuclei of the amygdala, ventral subiculum, infralimbic cortex or dorsolateral periaqueductal gray did not show differential activation in cocaine withdrawn rats compared to NaCl-treated rats, a small set of interconnected regions including the cingulate and dorsal prelimbic cortices, paraventricular thalamic nucleus, lateral and anterior hypothalamic areas exhibited a striking significantly lower number of Fos-expressing neurons in cocaine-withdrawn rats.

This specific neuroanatomical effect in cocaine withdrawn rats is a novel finding of interest in many respects. Our results are in line with observations made in two other rodent models of pathological anxiety, high anxiety BALB/c mice [49] or rodents selectively bred for high anxiety-related behaviors [47,50]. In these rodents, a blunted Fos response to anxiogenic situations was revealed in the cingulate cortex, but not in the prelimbic and infralimbic cortices, when compared to their low anxiety counterparts (respectively C57BL/6 mice and rodents selected for their low-anxiety related behaviors). Moreover, these studies, like our own, pointed to altered Fos responses in subcortical areas such as the paraventricular thalamic nucleus, anterior and lateral hypothalamic areas. Interestingly, the paraventricular thalamic nucleus and the lateral hypothalamus areas are interconnected to the mPFC [51–53] and have been involved in different aspects of anxiety [54,55]. Our data thus provide further link between this restricted corticolimbic network and anxiety and strongly suggest that it may contribute to different forms of pathological anxiety, including those induced by cocaine.

The differential effect of cocaine withdrawal on the reactivity of the dorsal and ventral subdivisions of the mPFC is relevant in regard to the complex organization of this structure.

Anatomical and functional studies have demonstrated a dorsoventral gradient along the mPFC, with the dorsal part (that includes the anterior cingulate and dorsal prelimbic cortices) primarily interconnected to regions that reportedly affect cognition, and the ventral part (that includes ventral prelimbic and infralimbic cortices) connected to autonomic/visceral related regions [51,53,56]. Consistent with this, multiple lines of evidence demonstrated that the ventral mPFC plays an important role in the generation of anxiety, based on the fact that focal lesions or local inactivation of this area have an anxiolytic effect in rats [57,58] and reduce the autonomic [59] and hormonal [60] responses to acute emotional stress. The role of the dorsal mPFC in innate anxiety is more controversial since some studies reported anxiolytic effects [57,61] while others reported anxiogenic effects [62,63] after its inactivation. This may be due to its modulatory influence on emotional behaviors and the fact that its involvement may vary according to the anxiogenic situations the rodents is faced with [64]. In view of our results, we may hypothesize that the high anxiety levels observed in cocaine withdrawn rats is linked to a poor recruitment of dorsal mPFC neurons leading to a decreased control over emotional and cognitive aspects of anxiety-related behaviors.

Our animal model also allowed us to go further into the cellular analysis of cocaine-induced alterations in the mPFC without the confounding obstacles commonly encountered in human studies such as polydrug abuse, premorbid psychiatric conditions and variable drug history. Since previous studies have reported the remodeling of cortical neuron dendrites [13,19], microischemia [65] and significant modifications in astroglial cell number, size and shape complexity [66] after chronic cocaine treatment, we first ensured that the decrease in Fos-expressing cell densities observed in the cocaine withdrawn rats was not confounded by structural changes in the cortex that could have led to modifications in neuronal cell densities. We next demonstrated that open arm exposure activated a majority of cortical glutamatergic pyramidal neurons (65 to 80% of activated neurons) whereas the remaining activated cells

were GABAergic interneurons. This ratio, which concords with the estimated proportion of these two populations of neurons in various cortical areas [67], was not affected in cocaine withdrawn rats. We conclude therefore that cocaine has no preferential action on the reactivity of glutamatergic or GABAergic cortical neurons involved in anxiety processing. However, how these subsets of cingulate and dorsal prelimbic glutamatergic outputs act to shape the high levels of anxiety observed in cocaine-treated rats is an important question to address in the future.

Although Fos is considered as a generic marker of acute neuronal activation and/or changes in cellular signaling [68] its expression might be modified by previous pharmacological treatment. It has been shown that chronic cocaine exposure induced the accumulation of Δ FosB, a highly stable splice variant of FosB which negatively regulates the expression of Fos [69–71]. Thus, if Δ FosB is expressed in cortical circuits involved in the expression or regulation of anxiety, it could account for the attenuated Fos response observed in cocaine withdrawn rats and for dysregulations of neuronal function [72] but not necessarily to an hyporeactivity. Clearly, further investigations are needed to determine whether the altered dorsal mPFC reactivity, for example, has a causal role in the exacerbated anxiety behaviors observed in cocaine withdrawn rats. Experiments allowing transient activation or inactivation of this sparsely distributed neural system would be suitable to address this issue.

To our knowledge, this is the first study to provide direct neural correlates for cocaine-induced disruption in ability to cope with highly anxiogenic situations. Our observations reinforcing the potential importance of the PFC in the negative sequelae of chronic cocaine exposure is in consonance with previous studies reporting neuroadaptations in corticostriatal-limbic circuits that underlie behavioral and cognitive aspects of cocaine dependence [13,18]. This animal model offers not only the opportunity to decipher the underlying

pathophysiological mechanisms of cocaine-induced anxiety, but also to develop new pharmacological tools for its treatment.

Disclosure/conflict of interest

The authors report no biomedical financial interests or conflicts of interest. The authors have declared that no competing interests exist.

Acknowledgements

We thank Dr Luc Denoroy for performing western blot analysis of Fos antibody.

Financial disclosure

This work was supported by several grants from the Université Claude Bernard Lyon I, Centre National pour la Recherche Scientifique et la Mission Interministérielle de Lutte contre la Drogue et la Toxicomanie. El Hage C. was supported by la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author Status

Conceived and designed the experiments: C.E-H; A.B

Performed and analyzed data: C.E-H; A-L.M; V.R; A.E; H.S; A.B

Wrote the paper: C.E-H; A.B

Final approval of the version to be published: C.E-H; L.Z; A.B

References

1. Gawin FH (1991) Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* 251: 1580–1586.
2. Chaplin TM, Hong K, Fox HC, Siedlarz KM, Bergquist K, et al. (2010) Behavioral arousal in response to stress and drug cue in alcohol and cocaine addicted individuals versus healthy controls. *Hum Psychopharmacol* 25: 368–376. doi:10.1002/hup.1127.
3. Contoreggi C, Herning RI, Koeppl B, Simpson PM, Negro PJ Jr, et al. (2003) Treatment-seeking inpatient cocaine abusers show hypothalamic dysregulation of both basal prolactin and cortisol secretion. *Neuroendocrinology* 78: 154–162. doi:10.1159/000072797.
4. Fox HC, Hong K-IA, Siedlarz K, Sinha R (2008) Enhanced Sensitivity to Stress and Drug/Alcohol Craving in Abstinent Cocaine-Dependent Individuals Compared to Social Drinkers. *Neuropsychopharmacology* 33: 796–805. doi:10.1038/sj.npp.1301470.
5. Fox HC, Talih M, Malison R, Anderson GM, Kreek MJ, et al. (2005) Frequency of recent cocaine and alcohol use affects drug craving and associated responses to stress and drug-related cues. *Psychoneuroendocrinology* 30: 880–891. doi:10.1016/j.psyneuen.2005.05.002.
6. Lejuez CW, Zvolensky MJ, Daughters SB, Bornovalova MA, Paulson A, et al. (2008) Anxiety Sensitivity: A Unique Predictor of Dropout Among Inner-city Heroin and Crack/Cocaine Users in Residential Substance Use Treatment. *Behav Res Ther* 46: 811–818. doi:10.1016/j.brat.2008.03.010.
7. Sinha R (2001) How does stress increase risk of drug abuse and relapse? *Psychopharmacology (Berl)* 158: 343–359. doi:10.1007/s002130100917.
8. Sinha R (2008) Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1141: 105–130. doi:10.1196/annals.1441.030.
9. Sinha R, Garcia M, Paliwal P, Kreek MJ, Rounsaville BJ (2006) Stress-induced cocaine craving and hypothalamic-pituitary-adrenal responses are predictive of cocaine relapse outcomes. *Arch Gen Psychiatry* 63: 324–331. doi:10.1001/archpsyc.63.3.324.
10. Canteras NS, Resstel LB, Bertoglio LJ, Carobrez A de P, Guimarães FS (2010) Neuroanatomy of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci* 2: 77–96.
11. Etkin A (2010) Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. *Curr Top Behav Neurosci* 2: 251–277.
12. Phillips M, Ladouceur C, Drevets W (2008) A neural model of voluntary and automatic emotion regulation: implications for understanding the pathophysiology and neurodevelopment of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 13: 829–857. doi:10.1038/mp.2008.65.
13. Kalivas PW, O'Brien C (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33: 166–180. doi:10.1038/sj.npp.1301564.
14. Volkow ND, Fowler JS, Wang G-J, Goldstein RZ (2002) Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem* 78: 610–624.
15. Bolla K, Ernst M, Kiehl K, Mouratidis M, Eldreth D, et al. (2004) Prefrontal Cortical Dysfunction in Abstinent Cocaine Abusers. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 16: 456–464. doi:10.1176/appi.neuropsych.16.4.456.
16. Ersche KD, Barnes A, Simon Jones P, Morein-Zamir S, Robbins TW, et al. (2011) Abnormal structure of frontostriatal brain systems is associated with aspects of impulsivity and compulsivity in cocaine dependence. *Brain* 134: 2013–2024. doi:10.1093/brain/awr138.
17. Franklin TR, Acton PD, Maldjian JA, Gray JD, Croft JR, et al. (2002) Decreased gray matter concentration in the insular, orbitofrontal, cingulate, and temporal cortices of

- cocaine patients. *Biol Psychiatry* 51: 134–142.
18. Goldstein RZ, Volkow ND (2011) Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci* 12: 652–669. doi:10.1038/nrn3119.
 19. Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1: 33–46. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.025.
 20. Tanabe J, Tregellas JR, Thompson L, Dalwani M, Owens E, et al. (2009) Medial orbitofrontal cortex gray matter is reduced in abstinent substance dependent individuals. *Biol Psychiatry* 65: 160–164. doi:10.1016/j.biopsych.2008.07.030.
 21. Goussakov I, Chartoff EH, Tsvetkov E, Gerety LP, Meloni EG, et al. (2006) LTP in the lateral amygdala during cocaine withdrawal. *Eur J Neurosci* 23: 239–250. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04538.x.
 22. Makris N, Gasic GP, Seidman LJ, Goldstein JM, Gastfriend DR, et al. (2004) Decreased absolute amygdala volume in cocaine addicts. *Neuron* 44: 729–740. doi:10.1016/j.neuron.2004.10.027.
 23. Tomasi D, Goldstein RZ, Telang F, Maloney T, Alia-Klein N, et al. (2007) Thalamo-cortical dysfunction in cocaine abusers: Implications in attention and perception. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 155: 189–201. doi:10.1016/j.psychresns.2007.03.002.
 24. Aujla H, Martin-Fardon R, Weiss F (2008) Rats with extended access to cocaine exhibit increased stress reactivity and sensitivity to the anxiolytic-like effects of the mGluR 2/3 agonist LY379268 during abstinence. *Neuropsychopharmacology* 33: 1818–1826. doi:10.1038/sj.npp.1301588.
 25. Harris GC, Aston-Jones G (1993) Beta-adrenergic antagonists attenuate withdrawal anxiety in cocaine- and morphine-dependent rats. *Psychopharmacology (Berl)* 113: 131–136.
 26. Markou A, Koob GF (1991) Postcocaine anhedonia. An animal model of cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 4: 17–26.
 27. Perrine SA, Sheikh IS, Nwaneshiudu C, Schroeder JA, Unterwald EM (2008) Withdrawal from chronic administration of cocaine decreases delta opioid receptor signaling and increases anxiety- and depression-like behaviors in the rat. *Neuropharmacology* 54: 355–364. doi:10.1016/j.neuropharm.2007.10.007.
 28. Rudoy CA, Van Bockstaele EJ (2007) Betaxolol, a selective beta(1)-adrenergic receptor antagonist, diminishes anxiety-like behavior during early withdrawal from chronic cocaine administration in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 1119–1129. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.04.005.
 29. Sarnyai Z, Bíró E, Gardi J, Vecsernyés M, Julesz J, et al. (1995) Brain corticotropin-releasing factor mediates “anxiety-like” behavior induced by cocaine withdrawal in rats. *Brain Res* 675: 89–97.
 30. Paine TA, Jackman SL, Olmstead MC (2002) Cocaine-induced anxiety: alleviation by diazepam, but not buspirone, dimenhydrinate or diphenhydramine. *Behav Pharmacol* 13: 511–523.
 31. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1978) “Behavioural despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51: 291–294.
 32. Colussi-Mas J, Geisler S, Zimmer L, Zahm DS, Béro A (2007) Activation of afferents to the ventral tegmental area in response to acute amphetamine: a double-labelling study. *Eur J Neurosci* 26: 1011–1025. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05738.x.
 33. Julien JF, Legay F, Dumas S, Tappaz M, Mallet J (1987) Molecular cloning, expression and in situ hybridization of rat brain glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Neurosci Lett* 73: 173–180.

34. Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, et al. (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21: RC181.
35. Leriche M, Méndez M, Zimmer L, Bérod A (2008) Acute ethanol induces Fos in GABAergic and non-GABAergic forebrain neurons: a double-labeling study in the medial prefrontal cortex and extended amygdala. *Neuroscience* 153: 259–267. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.069.
36. Paxinos G, Watson C (2004) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set*, Fifth Edition. 5th ed. Academic Press. 209 p.
37. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14: 149–167.
38. Basso AM, Spina M, Rivier J, Vale W, Koob GF (1999) Corticotropin-releasing factor antagonist attenuates the “anxiogenic-like” effect in the defensive burying paradigm but not in the elevated plus-maze following chronic cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 145: 21–30.
39. DeVries AC, Taymans SE, Sundstrom JM, Pert A (1998) Conditioned release of corticosterone by contextual stimuli associated with cocaine is mediated by corticotropin-releasing factor. *Brain Research* 786: 39–46. doi:10.1016/S0006-8993(97)01328-0.
40. Erb S, Kayyali H, Romero K (2006) A study of the lasting effects of cocaine pre-exposure on anxiety-like behaviors under baseline conditions and in response to central injections of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Biochem Behav* 85: 206–213. doi:10.1016/j.pbb.2006.08.002.
41. Frankowska M, Gołda A, Wydra K, Gruca P, Papp M, et al. (2010) Effects of imipramine or GABA(B) receptor ligands on the immobility, swimming and climbing in the forced swim test in rats following discontinuation of cocaine self-administration. *Eur J Pharmacol* 627: 142–149. doi:10.1016/j.ejphar.2009.10.049.
42. Filip M, Faron-Górecka A, Kuśmider M, Gołda A, Frankowska M, et al. (2006) Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Res* 1071: 218–225. doi:10.1016/j.brainres.2005.11.099.
43. Hall BJ, Pearson LS, Buccafusco JJ (2010) Effect of the use-dependent, nicotinic receptor antagonist BTMPS in the forced swim test and elevated plus maze after cocaine discontinuation in rats. *Neurosci Lett* 474: 84–87. doi:10.1016/j.neulet.2010.03.011.
44. D’Souza MS, Markou A (2010) Neural substrates of psychostimulant withdrawal-induced anhedonia. *Curr Top Behav Neurosci* 3: 119–178. doi:10.1007/7854_2009_20.
45. Kupferschmidt DA, Newman AE, Boonstra R, Erb S (2011) Antagonism of cannabinoid 1 receptors reverses the anxiety-like behavior induced by central injections of corticotropin-releasing factor and cocaine withdrawal. *Neuroscience*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784132>. Accessed 25 January 2012.
46. Duncan GE, Knapp DJ, Breese GR (1996) Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Res* 713: 79–91.
47. Salomé N, Salchner P, Viltart O, Sequeira H, Wigger A, et al. (2004) Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biol Psychiatry* 55: 715–723. doi:10.1016/j.biopsych.2003.10.021.
48. Silveira MC, Sandner G, Graeff FG (1993) Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 56: 115–118.
49. O’Mahony CM, Sweeney FF, Daly E, Dinan TG, Cryan JF (2010) Restraint stress-induced brain activation patterns in two strains of mice differing in their anxiety behaviour. *Behav Brain Res* 213: 148–154. doi:10.1016/j.bbr.2010.04.038.
50. Muigg P, Scheiber S, Salchner P, Bunck M, Landgraf R, et al. (2009) Differential

- Stress-Induced Neuronal Activation Patterns in Mouse Lines Selectively Bred for High, Normal or Low Anxiety. *PLoS ONE* 4. doi:10.1371/journal.pone.0005346.
51. Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212: 149–179. doi:10.1007/s00429-007-0150-4.
 52. Li S, Kirouac GJ (2011) Sources of inputs to the anterior and posterior aspects of the paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Struct Funct*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22086160>. Accessed 19 January 2012.
 53. Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51: 32–58. doi:10.1002/syn.10279.
 54. Li Y, Li S, Wei C, Wang H, Sui N, et al. (2010) Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus mediate anxiety-like responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 212: 251–265. doi:10.1007/s00213-010-1948-y.
 55. Singewald N, Salchner P, Sharp T (2003) Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol Psychiatry* 53: 275–283.
 56. Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 27: 555–579.
 57. Shah AA, Treit D (2004) Infusions of midazolam into the medial prefrontal cortex produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and shock-probe burying tests. *Brain Res* 996: 31–40.
 58. Stern CAJ, Do Monte FHM, Gazarini L, Carobrez AP, Bertoglio LJ (2010) Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience* 170: 214–222. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.06.080.
 59. Tavares RF, Corrêa FMA, Resstel LBM (2009) Opposite role of infralimbic and prelimbic cortex in the tachycardiac response evoked by acute restraint stress in rats. *J Neurosci Res* 87: 2601–2607. doi:10.1002/jnr.22070.
 60. Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE (2006) Regional Differentiation of the Medial Prefrontal Cortex in Regulating Adaptive Responses to Acute Emotional Stress. *The Journal of Neuroscience* 26: 12967–12976. doi:10.1523/JNEUROSCI.4297-06.2006.
 61. Albrechet-Souza L, Borelli KG, Carvalho MC, Brandão ML (2009) The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and Fos immunoreactivity. *Neuroscience* 164: 387–397. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.08.038.
 62. Jinks AL, McGregor IS (1997) Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Res* 772: 181–190.
 63. de Visser L, Baars AM, van 't Klooster J, van den Bos R (2011) Transient Inactivation of the Medial Prefrontal Cortex Affects Both Anxiety and Decision-Making in Male Wistar Rats. *Front Neurosci* 5. doi:10.3389/fnins.2011.00102.
 64. Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142: 1–20. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.06.027.
 65. Ren H, Du C, Yuan Z, Park K, Volkow ND, et al. (2011) Cocaine-induced cortical microischemia in the rodent brain: clinical implications. *Mol Psychiatry*. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22124273>. Accessed 14 December 2011.
 66. Bowers MS, Kalivas PW (2003) Forebrain astroglial plasticity is induced following withdrawal from repeated cocaine administration. *Eur J Neurosci* 17: 1273–1278.
 67. Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat

- prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 1100–1109. doi:10.1093/cercor/bhh070.
68. Kovács KJ (2008) Measurement of immediate-early gene activation- c-fos and beyond. *J Neuroendocrinol* 20: 665–672. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01734.x.
69. McClung CA, Ulevy PG, Perrotti LI, Zachariou V, Berton O, et al. (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain Res Mol Brain Res* 132: 146–154. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.05.014.
70. Perrotti LI, Weaver RR, Robison B, Renthal W, Maze I, et al. (2008) Distinct Patterns of Δ FosB Induction in Brain by Drugs of Abuse. *Synapse* 62: 358–369. doi:10.1002/syn.20500.
71. Renthal W, Carle TL, Maze I, Covington HE, Truong H-T, et al. (2008) Δ FosB Mediates Epigenetic Desensitization of the c-fos Gene After Chronic Amphetamine Exposure. *The Journal of Neuroscience* 28: 7344–7349. doi:10.1523/JNEUROSCI.1043-08.2008.
72. Robison AJ, Nestler EJ (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12: 623–637. doi:10.1038/nrn3111.

Table 1. Densities of neurons and astroglial cells and proportion of Fos-positive cells expressing vGlut1 mRNA or GAD mRNA in the mPFC. Quantification was performed in infralimbic, prelimbic and anterior cingulate cortices of cocaine- and saline-treated rats after open arm exposure. Data are expressed as mean \pm SEM of three rats from each group and represent the density of labeled cells/mm² or the percentage of Fos-expressing cells containing the mRNAs coding for vGlut1 or GAD.

Figure legends

Figure 1. Effects of cocaine withdrawal on anxiety-related behaviors. Behavior was assessed in the elevated plus-maze (A-C, n = 7-10), open arm (D-F, n = 10-14) and shock-probe burying tests (G-I, n = 10-14) in cocaine-treated rats (black bars) compared to saline-treated rats (white bars). Data are expressed as mean + SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01 versus saline-treated rats.

Figure 2. Effects of cocaine withdrawal on depression-related behaviors. Behavior was assessed in the sucrose preference (A, n = 5-6) and forced swim tests (B, n = 8-7) in cocaine-treated rats (black circles or black bars) compared to saline-treated rats (white circles or white bars). (A) Evaluation of the preference for 0.5% sucrose solution during 28 days of withdrawal. The small graph on the bottom right shows the measurement of a preference for the sucrose solution at different concentrations in naive rats. (B) Measurement of different behavioral parameters in the forced swim test performed at 2 days of cocaine withdrawal. Data are expressed as mean + SEM, ** p < 0.01, *** p < 0.001 versus saline-treated rats.

Figure 3. Schematic diagrams showing the 18 areas in which Fos expression was quantified. The diagrams adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1998) indicate the placement of grids for counting Fos-expressing cells. Bregma 3.2: VO, ventral orbital cortex; Bregma 2.7: Cg, cingulate cortex; dPrL, dorsal Prelimbic; vPrL, ventral prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; Pir, piriform cortex; Acb, accumbens nucleus; Bregma -0.26: LSV, lateral septum nucleus; Bregma -1.88: PVA, paraventricular thalamic nucleus; PVNp, parvocellular part of the paraventricular hypothalamic nucleus; AH, anterior hypothalamic area; LH, lateral hypothalamic area; Bregma -2.8: CeM, central nucleus of the amygdala; BLA, anterior part of basolateral amygdala; MeA, medial nucleus of the amygdala; Bregma -5.6: V1M, primary visual cortex; S, subiculum; Bregma -7.8: VLPAG: ventrolateral part of periaqueductal gray.

Figure 4. Effect of a 2-day cocaine withdrawal on Fos expression in cortical regions after open arm exposure. Cocaine-treated rats (black bars) were compared to saline-treated rats (white bars) under basal conditions (n=5-6) and after a 5-min exposure to the open arm test (n=7-12). Data are expressed as mean + SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the corresponding group of rats in basal conditions. # $p < 0.05$ versus saline-treated rats placed in the open arm.

Figure 5. Effect of a 2-day cocaine withdrawal on Fos expression in subcortical regions after open arm exposure. Cocaine-treated rats (black bars) compared to saline-treated rats (white bars) under basal conditions (n=5-6) and after a 5-min exposure to the open arm test (n= 7-12). Data are expressed as mean + SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus the corresponding group of rats in basal conditions. # $p < 0.05$ versus saline-treated rats placed in the open arm.

Figure 6. Photomicrographs showing double labeled cells in the cingulate cortex. Fos-GAD mRNA and Fos-vGlut1 mRNA expressing cells after exposure to the open arm are illustrated on photomicrographs A and B respectively. Arrows point to double labeled cells. In C is illustrated the distribution of GFAP-expressing cells (in black) and NeuN-expressing-cells (in brown). Scale bar = 20 μ m.

Figure 1

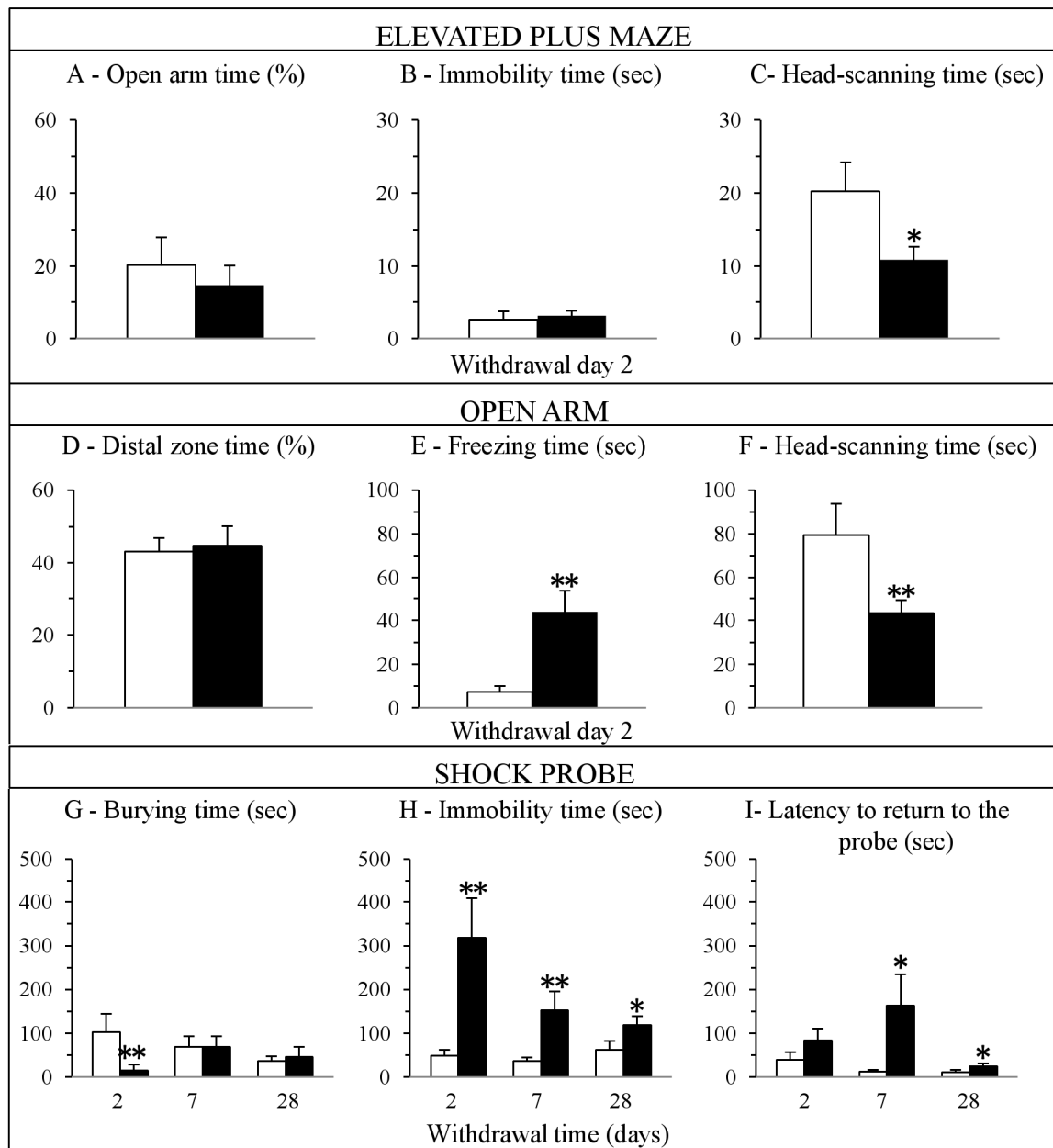


Figure 2

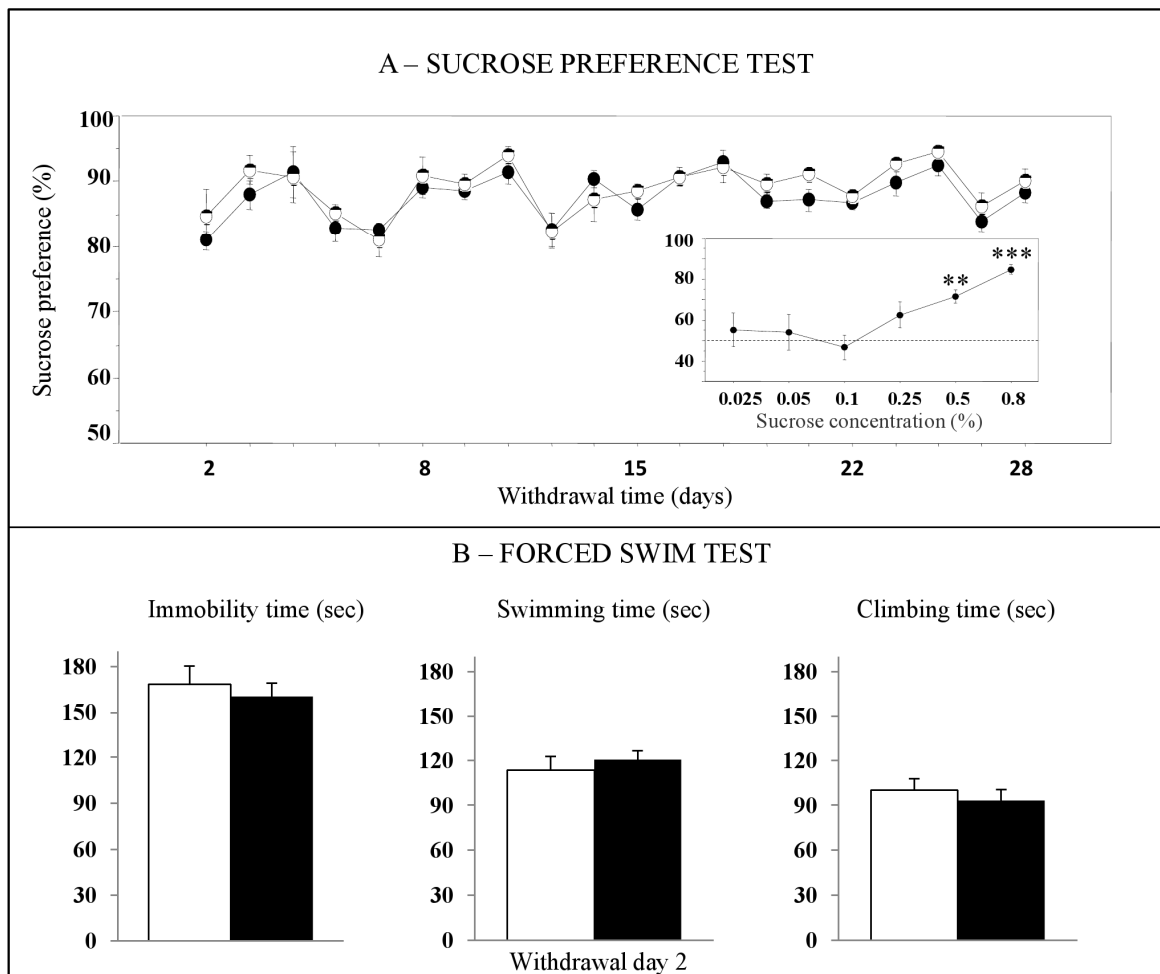


Figure 3

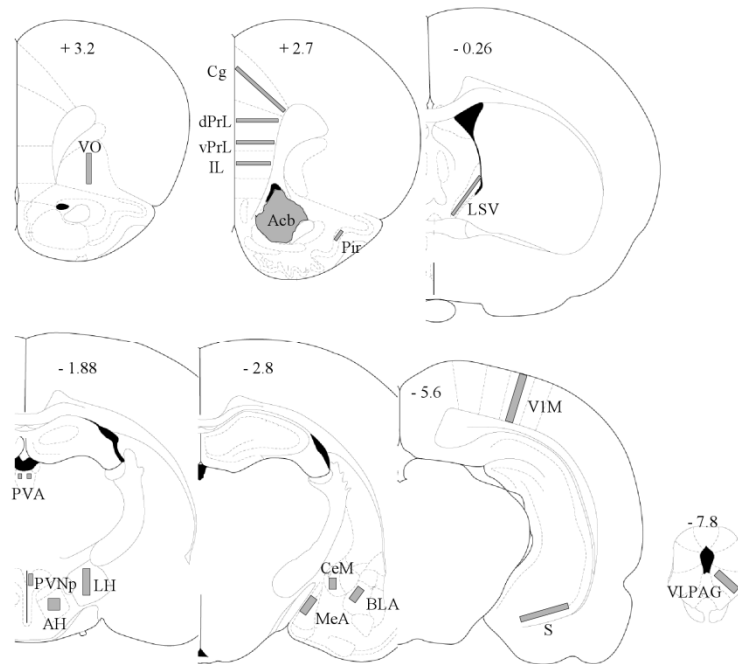


Figure 4

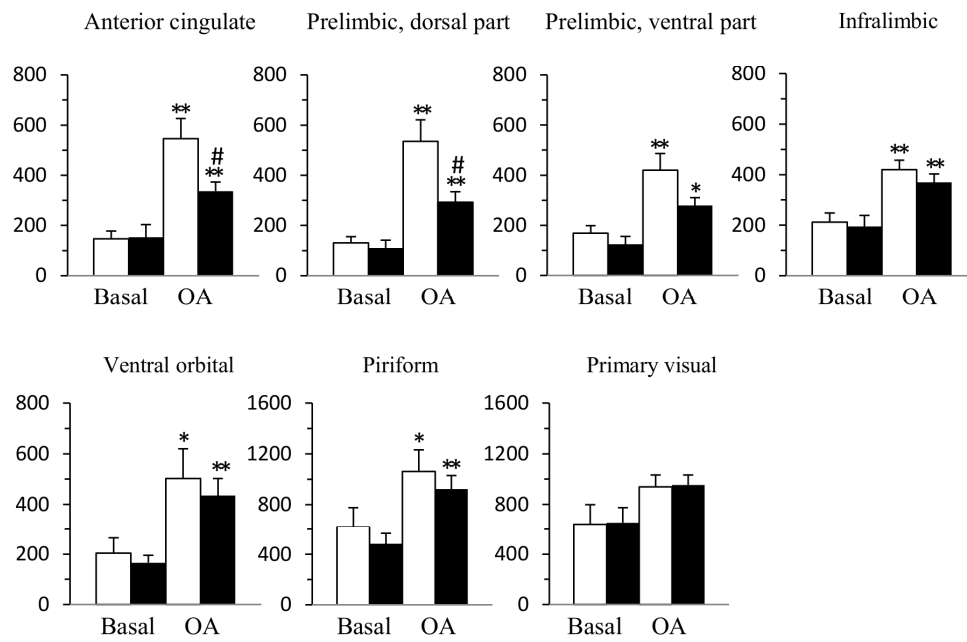


Figure 5

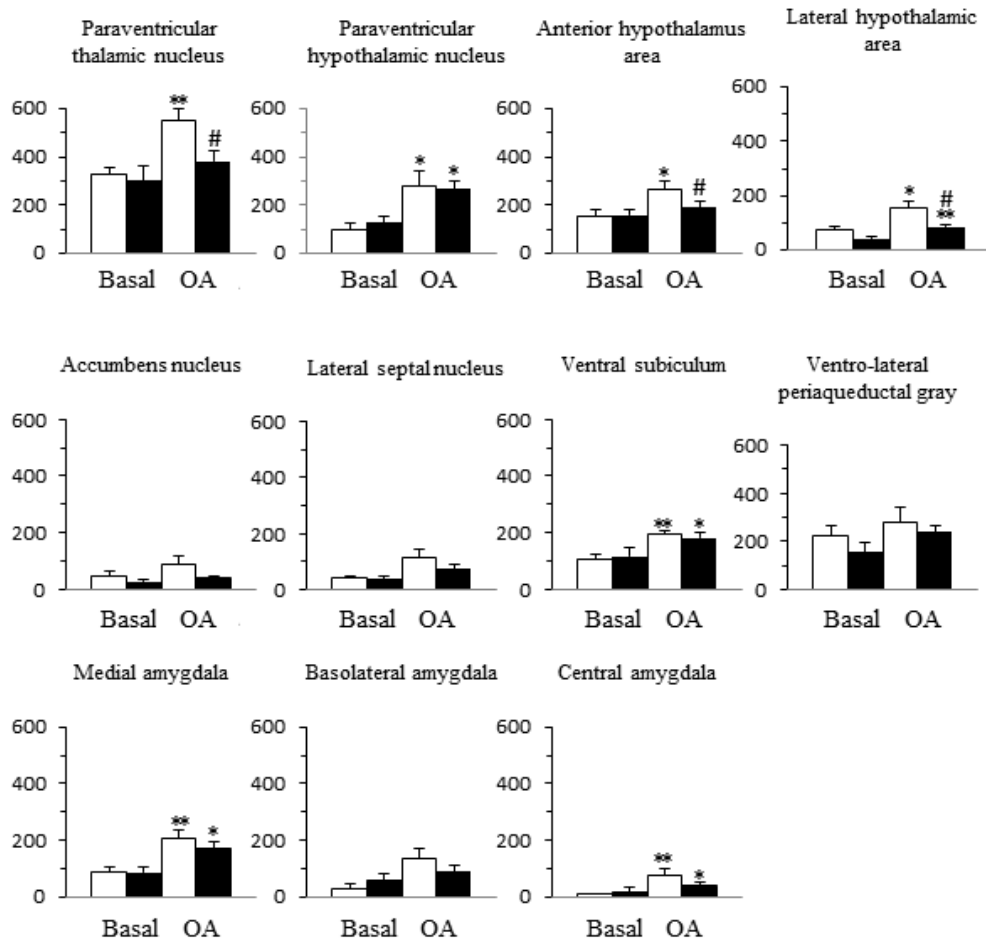


Figure 6

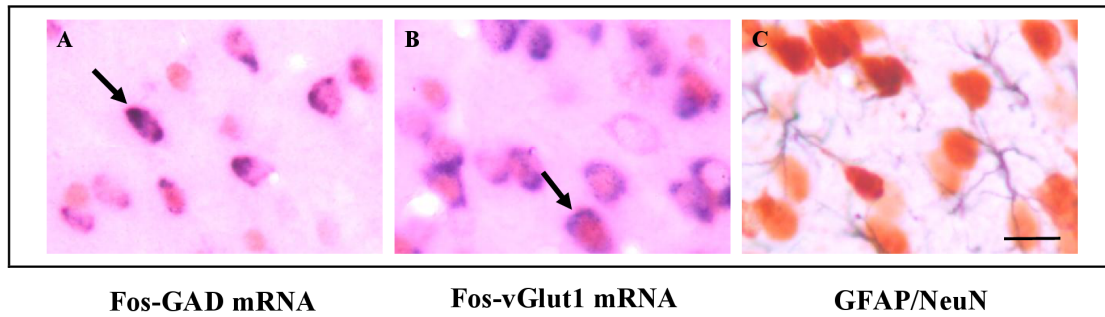


Table 1

	Infralimbic cortex		Prelimbic cortex		Anterior Cingulate cortex	
	Saline	Cocaine	Saline	Cocaine	Saline	Cocaine
NeuN	2275.11 ± 85.05	2376.12 ± 120.38	2089.38 ± 96.64	2218.24 ± 72.7	1546.26 ± 46.61	1927.91 ± 50.18
GFAP	722.19 ± 77.75	646.03 ± 62.91	607.13 ± 77.89	668.25 ± 134.46	496.23 ± 60.23	509.4 ± 32.74
% Fos-GAD	35.46 ± 4.42	28.32 ± 2.59	31.05 ± 3.20	25.22 ± 2.81	35.26 ± 8.58	36.52 ± 6.51
% Fos-vGlut1	65.56 ± 6.14	66.15 ± 3.66	71.92 ± 5.23	78.69 ± 3.41	75.79 ± 4.23	79.51 ± 5.96